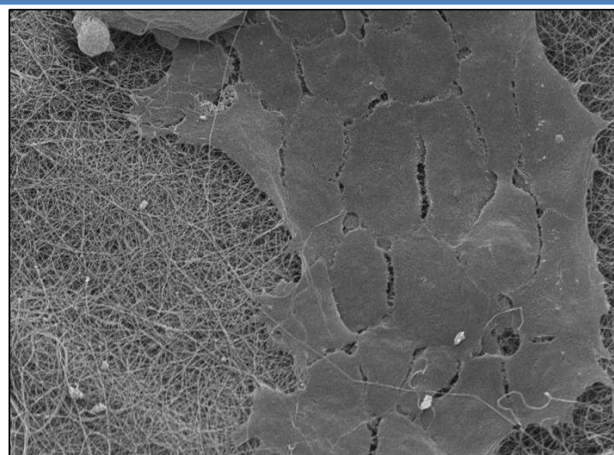
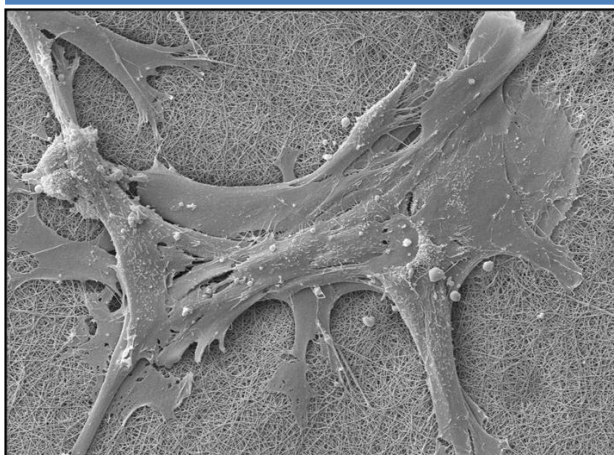

LABORATOIRE DE BIOLOGIE DES TISSUS CONJONCTIFS

Professeur A. Colige
Professeur B. Nusgens

**Contribution au développement d'un
pansement à base de chitosane pour
le traitement des plaies chroniques**



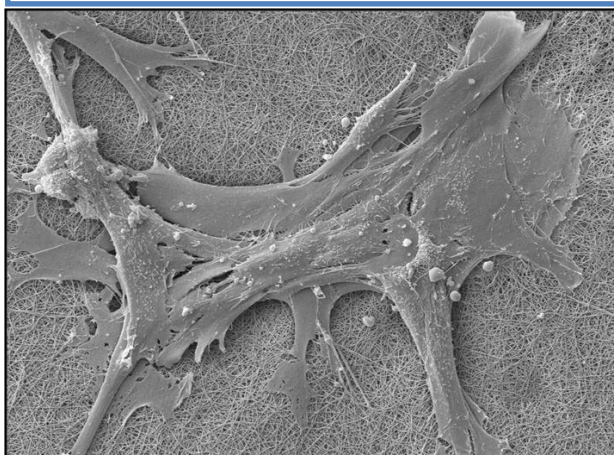
Victor TCHEMTCHOUA TATEU

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques

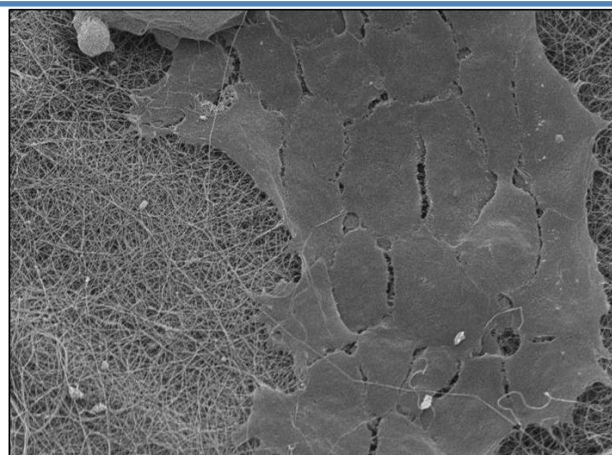
LABORATOIRE DE BIOLOGIE DES TISSUS CONJONCTIFS

Professeur A. Colige
Professeur B. Nusgens

Contribution au développement d'un pansement à base de chitosane pour le traitement des plaies chroniques



Fibroblastes sur tapis de chitosane nanofibrillaire



Kératinocytes sur tapis de chitosane nanofibrillaire

Victor TCHEMTCHOUA TATEU

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques

Année Académique 2011-2012

DEDICACE

« Une main toute seule ne peut pas applaudir »

Proverbe africain

A mes parents et grands parents,

A mes enfants Cindy, Nathan et Yanis,

A ma chère épouse Bridy,

A mes sœurs et frères,

A mes amies et amis.

REMERCIEMENTS

Je tiens avant tout à remercier profondément les professeurs Alain Colige et Betty Nusgens de m'avoir accueilli au sein de leur Laboratoire de recherche en Biologie des Tissus Conjonctifs et de m'avoir fait confiance durant toutes ces années. Leur rigueur scientifique et leur expertise, mais aussi et surtout leur patience, leur extrême dévouement, leurs qualités humaines et leur soutien m'ont permis de mener à bien ce projet d'envergure que représente un doctorat. Dès mes premiers pas en recherche, ils ont tous deux réussi à me donner le goût de la découverte scientifique. Travailler avec vous fut un réel plaisir et j'ose espérer, quoi qu'il advienne, que cela se reproduira dans l'avenir. Pour tout cela, Alain, Betty, très sincèrement merci.

Je voudrais également remercier la Région Wallonne qui a financé mes travaux de thèse. Je suis conscient que c'est une chance sans laquelle je n'aurais sans doute pas réalisé ce rêve. Je salue également l'Université de Liège, le GIGA et le Laboratoire de Biologie des Tissus Conjonctifs.

Je tiens à remercier très chaleureusement les différents collaborateurs qui sont intervenus de près ou de loin dans le cadre de ce projet et plus particulièrement le Laboratoire des Cellules et Tissus de Namur, le Centre d'Ingénierie des Protéines, le Centre d'Etude et de Recherche sur les Macromolécules et la société Kitozyme de Liège.

Je remercie vivement l'ensemble des membres du laboratoire pour leur accueil chaleureux qui m'a permis de m'intégrer au sein de leur équipe. Il n'est pas toujours facile d'écouter un nouveau dans la recherche. Merci pour votre apprentissage, votre patience, vos conseils et surtout votre gentillesse. Un merci particulier à Cocotte, grâce à toi j'ai pu, non seulement, améliorer mes compétences histologiques mais aussi diplomatiques ; à Nancy, pour sa disponibilité, sa compréhension, ses conseils et ses compétences graphiques ; à Marie-Jeanne, pour ses précieux conseils et son assistance technique ; à George pour m'avoir inculqué les rudiments de la culture cellulaire ; à Tony, à qui j'ai promis de prendre ma revanche à la course à pied dans un futur lointain ; à Johanne, pour son amitié et son soutien et enfin à Christine, pour sa disponibilité, sa compréhension, son amitié et ses conseils.

Toute ma reconnaissance va aussi à Christophe et Charlie pour leur enthousiasme, leur apport dans le raisonnement scientifique, leur regard critique et leurs connaissances dans des domaines très variés.

Merci également à Thibault, Romain, Eric, Audrey S, Audrey C, Alexia, Maude, Yves, Céline et Laurianne qui font partie de mon quotidien et à Frédéric, Giang, Pierre, Audrey H, Zakia et Bissan qui évoluent depuis sous d'autres cieux. Chacun d'entre vous a, à sa manière, contribué à la réussite de cette aventure scientifique et humaine.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance envers Emilie, Isabelle, Laurence, Patricia et Guy du Laboratoire de Biologie des Tumeurs et du Développement pour leur précieuse aide technique.

Je tiens aussi à remercier le Président et les Membres de mon comité de thèse pour avoir suivi l'évolution de mes travaux ainsi que les membres non liégeois du jury d'avoir accepté de juger ce travail de thèse et d'assister à sa défense publique.

Je terminerai en remerciant toutes les personnes donc les noms ne figurent pas dans ce manuscrit mais qui ont pourtant, de près ou de loin, contribué à la réalisation de ce travail.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADAM	A disintegrin and metalloproteinase
ADN	Acide désoxyribonucléique
α -SMA	A-Smooth muscle actin
CMC	Carboxymethylcellulose
CTGF	Connective tissue growth factor
DA	Degré d'acétylation
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
EGF	Epidermal growth factor
ECL	3-Amino-9-ethyl carbazole
FGF	Fibroblast growth factor
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor
HB-EGF	Heparin binding epidermal growth factor
HGF	Hepatocyte growth factor
IGF	Insulin-like growth factor
IL-1	Interleukine - 1
KGF	Keratinocyte growth factor
MAPK	Mitogen-associated protein kinase
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein - 1
MEC	Matrice extracellulaire
MMP	Matrix metalloproteinase
NGF	Nerve growth factor
NO	Nitric oxyde
PDGF	Platelet derived growth factor
PIGF	Placental growth factor
PI3K	Phosphoinositol-3-kinase
PVDF	Polyvinylidene fluoride
TGF- β	Transforming growth factor β
VEGF	Vascular endothelial growth factor
2-D	Bi-dimensional
3-D	Tri-dimensional

I. INTRODUCTION.....	1
I.1 LA PEAU HUMAINE.....	1
I.1.1 Structure et fonctions de la peau humaine.....	1
I.1.1.1 Organisation architecturale de la peau.....	1
I.1.1.2 Les diverses fonctions de la peau.....	2
I.1.1.2.a Protection.....	2
I.1.1.2.b Défense immunitaire.....	2
I.1.1.2.c Organe sensoriel.....	3
I.1.1.2.d Thermorégulation	3
I.1.1.2.e Métabolisme.....	3
I.1.1.2.f Absorption percutanée.....	3
I.1.2. Les différentes couches de la peau.....	4
I.1.2.1 L'épiderme.....	4
I.1.2.1.a Couche basale ou germinative.....	5
I.1.2.1.b Couche épineuse.....	5
I.1.2.1.c Couche granuleuse.....	5
I.1.2.1.d Couche de transition ou couche claire.....	6
I.1.2.1.e Couche cornée.....	6
I.1.2.1.f Les jonctions cellulaires.....	6
I.1.2.2. La jonction dermo-épidermique.....	7
I.1.2.3. Le derme.....	9
I.1.2.3.a Les cellules	9
I.1.2.3.b Les constituants protéiques de la matrice extracellulaire.....	10
I.1.2.4. L'hypoderme.....	12
I.1.3 Les annexes cutanées.....	13
I.1.4 Réseaux vasculaires sanguin et lymphatique.....	14
I.1.5 Les interactions cellules-matrice extracellulaire	14
I.2 LES PLAIES ET CICATRISATION CUTANEE.....	16
I.2.1 Les plaies.....	16
I.2.2 Le processus normal de cicatrisation.....	17
I.2.2.1 Phase inflammatoire.....	19
I.2.2.1.a Réponse vasculaire et hémostase... ..	19

I.2.2.1.b Réponse cellulaire et inflammation.....	20
I.2.2.2 Phase proliférative.....	21
I.2.2.2.a Réépithélialisation.....	21
I.2.2.2.b Reconstitution du derme.....	22
I.2.2.3 Phase de maturation.....	24
I.2.2.3.a Remodelage de la MEC.....	24
I.2.2.3.b Réduction de la densité cellulaire et régression vasculaire.....	24
I.2.2.4 Plaies chroniques.....	25
I.2.2.5 Les particularités du processus de cicatrisation chez la souris.....	27
I.3 LES PANSEMENTS.....	28
I.3.1 Les pansements interactifs	29
I.3.1.1 Les hydrogels	29
I.3.1.2 Les hydrocolloïdes	29
I.3.1.3 Les hydrocellulaires.....	29
I.3.1.4 Les alginates et les hydrofibres.....	30
I.3.1.5 Les interfaces et les films.....	30
I.3.1.6 Les pansements au charbon et à l'argent.....	30
I.3.2 Les pansements et dispositifs médicaux « bioactifs ».....	31
I.3.2.1 Matrice extracellulaire ou excipient contenant des protéines/molécules purifiées.....	31
I.3.2.2 Dispositifs contenant des cellules vivantes.....	31
I.3.2.3 Les biomatériaux	32
I.3.3 Autres traitements des plaies.....	32
I.3.4 Qualités d'un pansement « idéal » et de ses composants.....	33
I.3.5 Chitosane.....	33
I.3.5.1 Propriétés du chitosane.....	33
I.3.5.2 Applications thérapeutiques actuelles du chitosane.....	34
I.3.5.3 Nanofibres de chitosane.....	35
I.3.6 Les médiateurs biologiques.....	36
I.3.7 Peptides d'adhésion	38
II. BUTS ET PLAN DU TRAVAIL.....	39

III. RESULTATS.....	40
III.1 Chapitre 1 : Biocompatibilité et propriétés biologiques du chitosane.....	40
III.1.1 Publication 1: Development of a procedure to simultaneously isolate RNA, DNA and proteins for characterizing cells invading or cultured on chitosan scaffold.....	40
III.1.2 Publication 2: Development of a Chitosan Nanofibrillar Scaffold for Skin Repair and Regeneration.....	44
III.2 Chapitre 2 : Caractérisation des propriétés biologiques des protéines chimériques.....	50
III.2.1 Motifs d'adhésion cellulaire.....	51
III.2.2 Facteurs de croissance.....	55
III.2.2.1 HB-EGF chimérique recombinant (CBD-Ela-HB-EGF).....	56
III.2.2.2 FGF-2 chimérique recombinant (CBD-Ela-FGF-2).....	57
III.2.2.3 VEGF111 chimérique recombinant (CBD-Ela-VEGF111)	59
III.2.2.4 Effet du VEGF111 sur la cicatrisation.....	61
IV. DISCUSSION.....	64
V. CONCLUSION.....	77
VI. BIBLIOGRAPHIE.....	78

I. INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

I.1 LA PEAU HUMAINE

I.1.1 STRUCTURE ET FONCTIONS DE LA PEAU HUMAINE

La peau est un organe complexe recouvrant la totalité du corps. Avec une surface moyenne comprise entre 1,5 et 2 m² chez l'adulte et une masse équivalente à 15% du poids total d'un individu, elle en représente l'organe le plus volumineux [1]. Son épaisseur varie de 1 à 4 mm selon la région anatomique et les conditions auxquelles elle fait face [2-4]. Les phanères (poils et ongles) et de nombreuses glandes sébacées et sudoripares lui sont annexés [5].

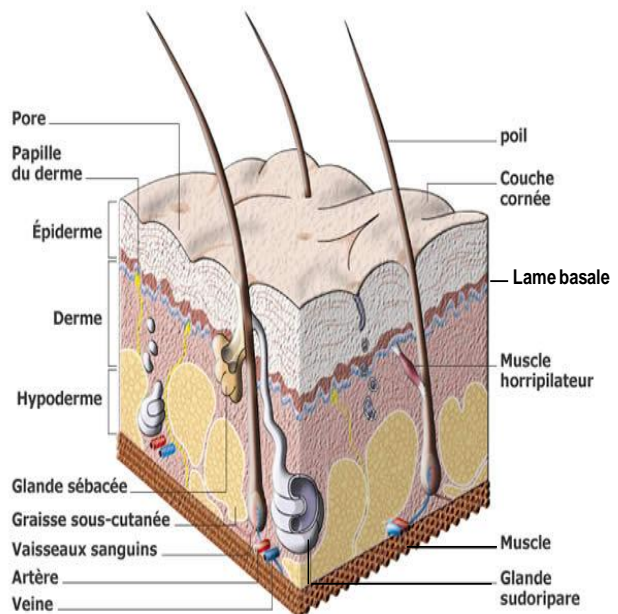
I.1.1.1 Organisation architecturale de la peau

La peau humaine normale (Fig. 1) est organisée en quatre régions principales superposées [2, 5].

Fig. 1: Représentation schématique d'une coupe de peau.

La surface externe de la peau est constituée par un épithélium malpighien kératinisé, l'épiderme, dont l'épaisseur varie selon les contraintes et les conditions de déshydratation auxquelles il est soumis. Cet épiderme s'ancre, par l'intermédiaire d'une lame basale, à une couche épaisse et dense de tissu fibro-élastique, le derme, qui est vascularisé et contient de nombreux récepteurs sensoriels. Le derme est relié aux tissus sous-jacents par une couche de tissu conjonctif plus lâche, l'hypoderme, qui contient du tissu adipeux en quantité variable. Les glandes sébacées, les glandes sudoripares, les poils et les ongles sont des structures épithéliales appelées annexes épidermiques car ils sont formés à partir d'invaginations épidermiques dans le derme et l'hypoderme

(www.futura-science.com).



La couche la plus superficielle, l'**épiderme**, d'origine ectodermique, est un tissu mince majoritairement composé d'un épithélium pavimenteux stratifié, kératinisé, non vascularisé mais innervé [5]. Il s'ancre au **derme** sous-jacent, d'origine mésodermique, par l'intermédiaire d'une fine structure acellulaire appelée lame basale. Cette jonction dermo-épidermique n'est pas plane ni régulière puisque des crêtes épidermiques s'enfoncent dans les

couches plus profondes de la peau alors que, à l'inverse, des extensions dermiques (papilles) se projettent dans l'épiderme. Il en résulte un accroissement de la surface de contact qui s'accompagne d'un renforcement de l'ancrage dermo-épidermique [6]. La couche la plus profonde de la peau, l'**hypoderme**, est également d'origine mésodermique [5]. Il constitue le prolongement du derme et est caractérisé par la présence de travées conjonctives lâches et de tissu adipeux [5]. L'hypoderme s'ancree sur les tissus et organes sous-jacents du côté interne, fixant ainsi la peau au reste du corps.

I.1.1.2 Les diverses fonctions de la peau

La peau et ses annexes ont de multiples fonctions indispensables à la vie, dont les principales sont brièvement rappelées ci-dessous.

I.1.1.2.a Protection

Chacun des compartiments cutanés contribue à protéger efficacement l'organisme envers différents types d'agressions extérieures, qu'elles soient de nature physique (stress mécanique, radiations ...), chimique ou biologique [7-9]. Une des fonctions vitales de l'épiderme est de limiter les pertes en eau, grâce à l'organisation spécifique de sa couche la plus externe (couche cornée). La présence de lipides épidermiques, majoritairement des céramides, des acides gras libres et le cholestérol, est également essentielle à la fonction barrière de la peau [8, 9].

I.1.1.2.b Défense immunitaire

La peau participe aux mécanismes d'immunité innée et adaptative [10]. En plus de son rôle lié à la protection physique contre les agents pathogènes [11], elle contient de nombreuses cellules leucocytaires, tels les lymphocytes T et B, les cellules dendritiques présentatrices d'antigènes, les mastocytes, les polynucléaires neutrophiles et les macrophages [12]. Le nombre et la proportion de ces différentes cellules sont variables et peuvent être très significativement modifiés aux sites de réaction inflammatoire. Les fibroblastes et les kératinocytes participent également à la réponse immunitaire par la production de nombreux facteurs de croissance et cytokines [1, 10, 13]. En complément à ces différentes stratégies antimicrobiennes, la sécrétion par les cellules épithéliales et immunitaires de petits peptides antimicrobiens, dont les cathélicidines et les beta-défensines, est de plus en plus reconnue comme un mécanisme important de défense envers les pathogènes [14].

1.1.1.2.c Organe sensoriel

La peau est un organe fortement innervé qui participe à la perception de différents stimuli [15, 16]. Ce rôle sensoriel est triple et concerne le sens tactile (toucher, pression, vibration), la sensibilité thermique et la sensibilité nociceptive à l'origine de la douleur en cas de dommage tissulaire [15, 17]. Différents types cellulaires présents dans la peau expriment des neuropeptides et neurotransmetteurs ainsi que leurs récepteurs respectifs [12, 18].

1.1.1.2.d Thermorégulation

La peau est la principale interface par laquelle l'organisme contrôle sa température interne [19, 20]. A cette fin, elle est capable d'enregistrer la température externe, d'évacuer une chaleur interne excessive (par vasodilatation artériolaire et évaporation de la transpiration) ou, au contraire, de tenter de limiter la perte en calories par l'organisme (vasoconstriction artériolaire, contraction du muscle arrecteur des poils) [20-22]. Le tissu adipeux sous-cutané et, dans une moindre mesure chez l'homme, les poils servent d'isolants thermiques [23].

1.1.1.2.e Métabolisme

L'épiderme constitue une source majeure de vitamine D pour l'organisme. Durant l'exposition aux rayons ultraviolets, la peau participe à la synthèse de la vitamine D nécessaire à l'homéostasie calcique, au métabolisme osseux et à la régulation du système immunitaire cutané [14, 24, 25]. La peau est un site de synthèse ou de transformation de nombreux facteurs de croissance, cytokines, hormones et neuropeptides [1, 12, 17, 18]. Un autre rôle métabolique de la peau est l'exsudation avec drainage d'eau mais aussi de NaCl et autres minéraux. Enfin, le tissu adipeux sous-cutané (hypoderme) représente une réserve importante d'énergie sous forme de triglycérides principalement [2].

1.1.1.2.f Absorption percutanée

Certaines substances appliquées sur la peau peuvent traverser la couche cornée, puis diffuser à travers l'épiderme avant d'être résorbées dans les capillaires dermiques [26, 27]. C'est ainsi que diverses molécules thérapeutiques, dont les anti-inflammatoires non-stéroïdiens, peuvent être administrées par application topique [27].

I.1.2. LES DIFFERENTES COUCHES DE LA PEAU

I.1.2.1 L'épiderme

L'épiderme est la couche de la peau qui est en contact direct avec l'environnement. Son épaisseur varie de 50 μm à 1 mm selon les régions anatomiques [2, 12]. Il est constitué à plus de 80 % par des kératinocytes à différents stades de différenciation (Fig. 2), les autres types cellulaires étant principalement les mélanocytes responsables de la pigmentation et de la photoprotection de la peau, les cellules de Langerhans, dérivées des monocytes et dont la fonction consiste à phagocyter et à présenter les antigènes aux lymphocytes T, et enfin les cellules de Merkel qui jouent le rôle de récepteur sensoriel [2, 5, 28, 29].

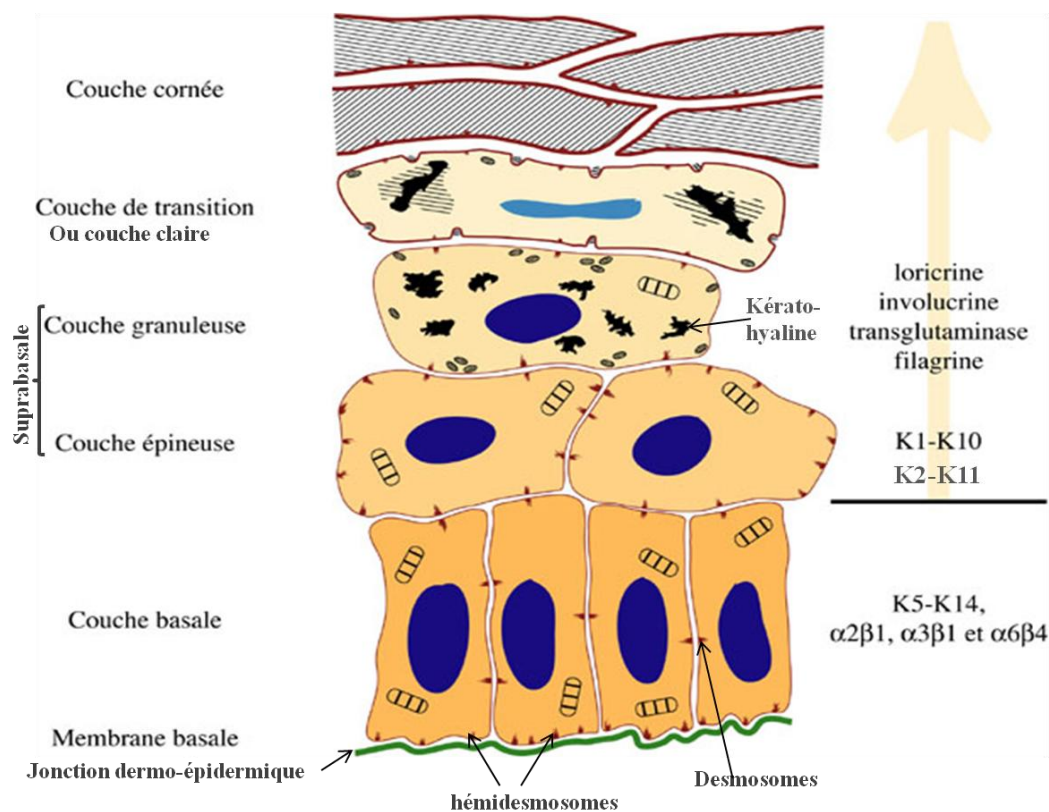


Fig. 2 : Différenciation des kératinocytes dans l'épiderme.

Les kératinocytes se différencient et migrent de la couche basale vers la surface où ils desquament. Certaines protéines pouvant servir de marqueurs de différenciation sont indiquées à droite en lien avec la couche où elles sont spécifiquement exprimées ($\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta$: intégrines ; K5-K14, K1-K10, K2-K11 : kératines). Illustration modifiée, d'après <http://archimede.bibl.ulaval.ca>.

L'épiderme est une structure qui se renouvelle constamment en conditions homéostasiques afin de remplacer les cellules superficielles qui desquament naturellement ou sont arrachées par abrasion mécanique. Ce renouvellement s'opère à partir des kératinocytes apposés à la lame basale par un processus bien caractérisé où interviennent prolifération, migration et

différenciation cellulaires. Sur ces bases, l'épiderme peut être divisé schématiquement en différentes couches successives représentées dans la figure 2.

1.1.2.1.a Couche basale ou germinative

La couche basale, ou germinative, est essentiellement formée de kératinocytes de forme cuboïde, polarisés et capables de division cellulaire [30-34]. On y retrouve également des cellules de Merkel et des mélanocytes. Outre leur forme cubique et leur arrangement très serré, les cellules de la couche basale sont caractérisées par un cytosquelette renfermant des filaments intermédiaires de kératines, principalement les types 5 et 14 [28, 30, 35-38]. Latéralement, elles sont connectées entre elles par différents types de jonctions intercellulaires, dont principalement les desmosomes [1, 2], alors qu'elles s'ancrent fermement à la lame basale par l'intermédiaire d'hémidesmosomes, des structures d'adhésion contenant notamment des intégrines. Les kératines 5 et 14 ainsi que les intégrines $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$ et $\alpha_6\beta_4$ sont considérées comme des marqueurs de la couche basale

1.1.2.1.b Couche épineuse

Chez l'homme, cette couche est formée de 3 à 5 assises cellulaires. On y note la présence de nombreux desmosomes assurant une forte adhésion intercellulaire. Les cellules de la couche épineuse cessent de synthétiser les kératines 5 et 14 en faveur des kératines 1 et 10 qui sont ainsi considérées comme des marqueurs des couches supra-basales [28, 34]. Au niveau le plus superficiel de la couche épineuse, les cellules ont tendance à s'aplatir et commencent à exprimer la kératine 2, ce qui en fait un marqueur supplémentaire de différenciation. Elles sont ensuite progressivement poussées vers la couche supérieure.

1.1.2.1.c Couche granuleuse

Cette couche est composée de quelques rangées de cellules plus aplaties et étirées, s'alignant parallèlement à la surface de la peau [2]. Les noyaux des cellules de la couche granuleuse sont en voie de dégénérescence, mais toujours actifs. Ces cellules expriment les kératines 2 et 11 [28] qui occupent plus de 85% de leur cytoplasme [1]. De nombreux corps lamellaires et des granules de kératohyaline sont également observés [2, 39]. Ces granules sont des agrégats de protéines insolubles, principalement de la loricrine et de la filaggrine (filament aggregating activity), capables d'interagir avec les filaments de kératine et de les condenser, contribuant ainsi à la compaction cellulaire [40]. Les kératinocytes les plus différenciés de cette couche déversent le contenu des corps lamellaires dans l'espace extracellulaire et commencent à

élaborer une enveloppe cornée (involucrine, loricrine, Small proline-rich proteins) sur la face interne de la membrane plasmique, ce qui est un marqueur de différenciation tardive de cette zone [5, 40].

1.1.2.1.d Couche de transition ou couche claire

Cette couche constitue une transition entre la couche granuleuse encore métaboliquement active et la couche cornée inerte. Elle n'est présente que dans la peau épaisse et glabre, comme celle de la plante des pieds et de la paume des mains. Elle est constituée de trois à cinq rangées de cellules mortes, aplaties, transparentes et présentant une forte activité enzymatique lysosomale dégradant le noyau et les organelles.

1.1.2.1.e Couche cornée

La couche cornée est le produit final de la différenciation épidermique. Elle est constituée de 5 à 10 rangées de cornéocytes qui sont des cellules mortes très épaisses de forme hexagonale et dépourvues de noyau et d'organelles [2, 41, 42]. Les lipides intercellulaires, provenant principalement des corps lamellaires et composés de céramides (45-50%), de cholestérol (25%) et d'acides gras (10-15%), combleront l'espace intercellulaire [7, 9, 41, 43]. Les lipides intercellulaires contribuent au maintien de l'hydratation de la couche cornée, de ses propriétés de distension et d'élasticité et, conséquemment de sa fonction de barrière [43]. Les cellules de cette couche desquament graduellement et sont remplacées par des cellules de la couche inférieure, complétant ainsi le processus de différenciation épidermique.

1.1.2.1.f Les jonctions cellulaires

Les jonctions cellulaires sont des structures particulièrement abondantes dans les tissus épithéliaux. Constituées de complexes protéiques, elles permettent l'adhésion des cellules entre elles et à la lame basale afin d'assurer la cohésion et la communication au sein du tissu épithélial [44]. Les principales sont (Fig. 3) :

- Les **jonctions étanches ou serrées** qui assurent la cohésion des cellules entre elles et l'étanchéité entre deux compartiments tissulaires [41, 45]. Présentes dans la couche granuleuse [41, 46], elles contribueraient à la fonction de barrière cutanée [47].
- Les **desmosomes** sont des jonctions intercellulaires hyperadhésives auxquelles s'attachent le cytosquelette de kératine [8, 48, 49], alors que les **hémidesmosomes** attachent les cellules épithéliales de la couche germinative à la lame basale.

- Les **jonctions communicantes** qui permettent la diffusion paracellulaire de molécules de poids moléculaire inférieur à 1.5 kDa (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , métabolites, seconds messagers) [8, 50]. Elles sont essentiellement présentes dans la couche épineuse [51].

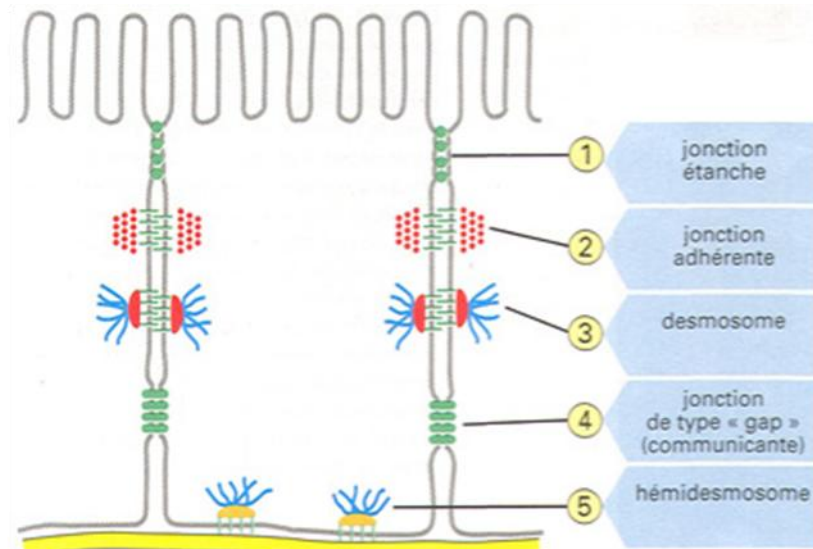


Fig. 3 : Les jonctions cellulaires épithéliales.

Les jonctions serrées, les jonctions adhérentes (Zonula adherens), les jonctions communicantes et les desmosomes permettent l'attachement des cellules entre elles, tandis que les hémidesmosomes permettent l'ancrage cellulaire à la lame basale (www.humans.be).

I.1.2.2. La jonction dermo-épidermique

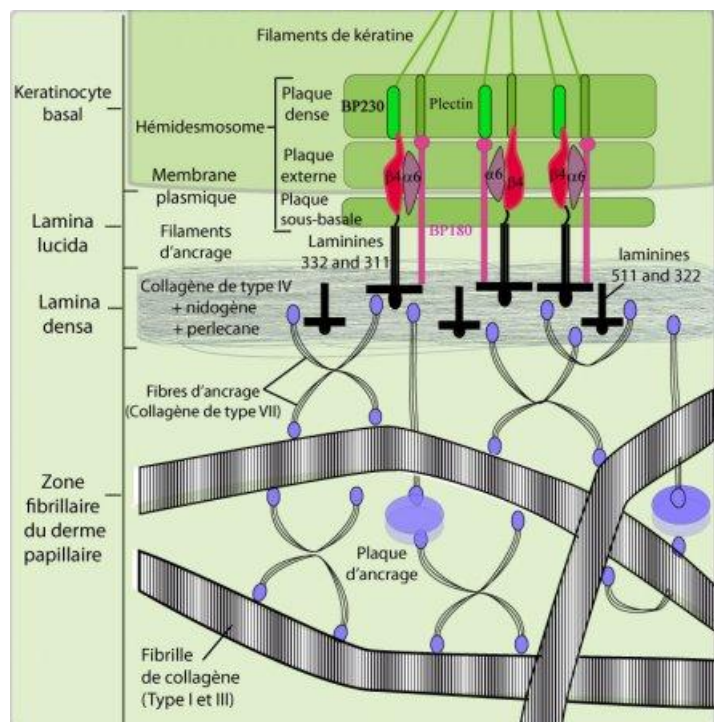
Histologiquement, l'épiderme et le derme sont physiquement séparés par une structure appelée jonction dermo-épidermique formée à partir de composants synthétisés par ces deux compartiments adjacents (Fig. 4). Quatre zones sont classiquement distinguées, de l'épiderme vers le derme :

- La première est constituée de la **membrane plasmique** des cellules de la couche basale de l'épiderme. Les kératinocytes basaux possèdent des structures d'attachement à leur face ventrale : les hémidesmosomes. Ceux-ci sont absents des mélanocytes, qui présentent des systèmes d'adhésion focale, et des cellules de Merkel qui possèdent des densifications de leur membrane plasmique au contact de la terminaison nerveuse qui leur est associée.
- La **lamina lucida**, d'épaisseur variant entre 40 et 50 nm [52], est directement en contact avec la membrane plasmique des cellules de la couche basale de l'épiderme. Elle est formée par l'agencement de protéoglycanes et de glycoprotéines [53], dont les laminines 332 (anciennement laminine 5) et 311 (anciennement laminine 6), qui

- s'organisent en fins filaments d'ancrage et participent à l'attachement des cellules basales à la matrice [54].
- La **lamina densa**, parallèle à la lamina lucida et d'épaisseur comprise 30 et 60 nm [2, 52], est majoritairement composée de collagène de type IV mais aussi des laminine 10 et 7, de nidogène et de protéoglycanes [28, 52, 55]. Elle constitue une zone d'ancrage intermédiaire pour les filaments issus de l'épiderme et les fibres d'ancrage issues de la zone fibrillaire du derme papillaire.
 - La **zone fibrillaire** est le compartiment assurant le contact étroit avec le derme. Elle constitue une zone fibreuse qui contient une grande variété de composants dont le collagène de type VII qui participe à former des structures solides entre la lamina densa et le derme papillaire, notamment au niveau des fibres de collagène dermique, de types I, III et V [56].

Fig. 4 : Organisation de la jonction dermo-épidermique.

Un kératinocyte basal s'ancre à la matrice sous-jacente principalement par l'intermédiaire d'hémidesmosomes. Un hémidesmosome ancre le cytosquelette cellulaire de kératines à la lame basale. Il est composé d'une plaque dense (BP230 et plectine) et de protéines transmembranaires (BP180 ou collagène XVII et intégrine $\alpha_6\beta_4$) qui s'organisent et forment une plaque sous-basale dans la lamina lucida. Les laminines 332 et 311 situées dans la lamina densa se lient à la portion extracellulaire de l'intégrine $\alpha_6\beta_4$ localisée à la face ventrale des kératinocytes pour former un complexe d'adhésion, les hémidesmosomes. Des ancrages s'organisent également en dehors des hémidesmosomes, par l'intermédiaire de liaison entre



l'intégrine $\alpha_3\beta_1$ et des molécules de laminine notamment. Ces complexes de laminines sont associés au réseau de collagène IV par l'intermédiaire du nidogène. Des fibrilles d'ancrage de collagène VII, liées à la laminine 332 ou au collagène IV, quittent la lamina densa et s'enracinent dans la lame réticulaire en se liant aux fibres de collagène fibrillaire (I, III, V) et à des plaques d'ancrage (www.biologiedelapeau.fr).

La jonction dermo-épidermique joue plusieurs rôles essentiels au bon fonctionnement de la peau [2, 52, 56, 57]. Elle procure un accrochage optimal entre derme et épiderme. Ceci est

notamment illustré dans diverses pathologies, héréditaires ou acquises (épidermolyse et pemphigoïde bulleuses, par exemple) [6, 49, 52, 56]. Elle sert de support mécanique pour l'adhésion de l'épiderme au derme et contribue à maintenir la polarité et le phénotype des kératinocytes basaux, leur organisation spatiale et donc la structure de l'épiderme [55, 58-60]. La membrane basale permet la diffusion contrôlée des molécules et la migration cellulaire entre les compartiments dermique et épidermique [6, 58]. Enfin, elle joue également un rôle fondamental au cours de la réépidermalisation de la cicatrisation cutanée en servant, au travers des glycoprotéines qui la constituent (principalement les laminines), de support pour l'adhésion et la migration des kératinocytes.

I.1.2.3. Le derme

Le derme confère à la peau sa résistance mécanique, son extensibilité, son élasticité et une certaine compressibilité, rôle surtout joué par le tissu adipeux sous-cutané [2]. Il permet l'apport de nutriments à l'épiderme par diffusion à partir des vaisseaux sanguins qui le parcourent. Le derme, dont l'épaisseur varie de 2 à 4 mm selon la localisation anatomique, est classiquement divisé en deux régions qui diffèrent par la composition et l'organisation de leur matrice extracellulaire respective :

Le **derme papillaire** (1/5 de l'épaisseur du derme) est composé de fines fibrilles de collagène (de types I et III) et d'élastine qui s'entrecroisent pour former un réseau irrégulier et peu dense [5]. Ces fibres sont orientées le plus souvent perpendiculairement ou obliquement par rapport au plan de la membrane basale.

Le **derme réticulaire** (4/5 de l'épaisseur du derme) est moins cellularisé, vascularisé et innervé que le derme papillaire. Il est constitué d'une matrice extracellulaire composée essentiellement de faisceaux de fibres de collagène et de grosses fibres élastiques qui s'orientent parallèlement aux lignes de tension (surface de la peau), ce qui confère à la peau l'essentiel de ses propriétés rhéologiques. Les espaces interfibrillaires sont occupés par les protéoglycanes (substance fondamentale), des follicules pileux, des nerfs, des glandes sébacées et des canaux de glandes sudoripares.

I.1.2.3.a Les cellules

Les cellules les plus abondantes du derme sont les fibroblastes, cellules d'origine mésodermique remplissant diverses fonctions dans les tissus conjonctifs. Ils sont responsables de la synthèse de la majeure partie des constituants de la MEC (matrice extracellulaire) mais sont également une source importante de protéases capables de dégrader

les composants matriciels. Le derme héberge des réseaux nerveux et vasculaires (artériels, veineux et lymphatiques) et la naissance des annexes épidermiques. Il contient également des leucocytes, particulièrement au cours des épisodes inflammatoires. Les fibroblastes participent à l'homéostasie de la MEC en produisant diverses enzymes régulant les différentes étapes de son renouvellement. A ce titre, ils jouent un rôle majeur dans la cicatrisation en raison de leur plasticité d'action et de leur capacité à interagir avec leur environnement. Dans une peau adulte non lésée, les fibroblastes sont dans un état quiescent (fibrocytes), avec notamment un réticulum endoplasmique de petite taille et un noyau aplati et hétérochromatique. Lors d'un traumatisme, divers facteurs de croissance (TGF- β , EGF, PDGF, FGFs, ...), relargués par les plaquettes ou sécrétés par les cellules épidermiques et par les leucocytes, activent les fibroblastes. Outre la régulation par des médiateurs diffusibles, les fibroblastes peuvent également être activés par d'autres systèmes comme les radicaux libres, le contact avec des composants extracellulaires, des interactions directes avec d'autres types cellulaires (épidermiques, inflammatoires, vasculaires, ...) ou encore par l'état de tension mécanique des structures matricielles avec lesquelles ils interagissent. C'est l'intégration de ces différents signaux qui va moduler le phénotype biosynthétique des fibroblastes. A titre d'exemple, une telle activation peut conduire à une sur-expression de diverses MMPs, favorisant ainsi la dégradation et le remaniement du tissu conjonctif, ou de facteurs de croissance (EGF, FGFs, HGF, IGF, ...) régulant le comportement des cellules voisines (autres fibroblastes, cellules épidermiques, endothéliales, nerveuses, ...). Une autre fonction clé de ces fibroblastes activés est la régulation de la réponse immunitaire, notamment par sécrétion de cytokines (IL-1, ...) et de chimiokines (MCP1, ...).

1.1.2.3.b Les constituants protéiques de la matrice extracellulaire

Les principales structures des tissus conjonctifs peuvent être classées en trois catégories : les faisceaux de fibres de collagène, les fibres élastiques et les microfibrilles. Ces réseaux fibrillaires sont maintenus dans un gel visco-élastique hydraté composé de glycoaminoglycanes, de protéoglycanes et de glycoprotéines. En raison de leur rôle essentiel dans l'architecture de la matrice extracellulaire dermique, seule l'information relative aux collagènes sera brièvement mentionnée.

Les collagènes (Fig. 5) comptent parmi les protéines les plus abondantes du règne animal. Ils jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité structurelle de la plupart des tissus. Ils sont par ailleurs impliqués dans d'autres processus biologiques essentiels comme l'adhésion et la migration cellulaire. L'interaction dynamique entre les cellules et les molécules de

collagène est un élément clé du modelage tissulaire qui se déroule durant la croissance, la différenciation, la morphogenèse, la cicatrisation ainsi que dans de nombreux états pathologiques. Toutes les molécules de collagène sont formées de trois chaînes polypeptidiques, appelées chaînes α , qui s'associent pour former au moins un domaine en triple hélice au niveau d'une séquence répétitive de type $(\text{Gly-X-Y})_n$ où les positions X et Y sont le plus souvent, mais non exclusivement, occupées respectivement par une proline et une hydroxyproline [61-63]. Cette composition et cette distribution caractéristiques sont requises pour la stabilité de la triple hélice.

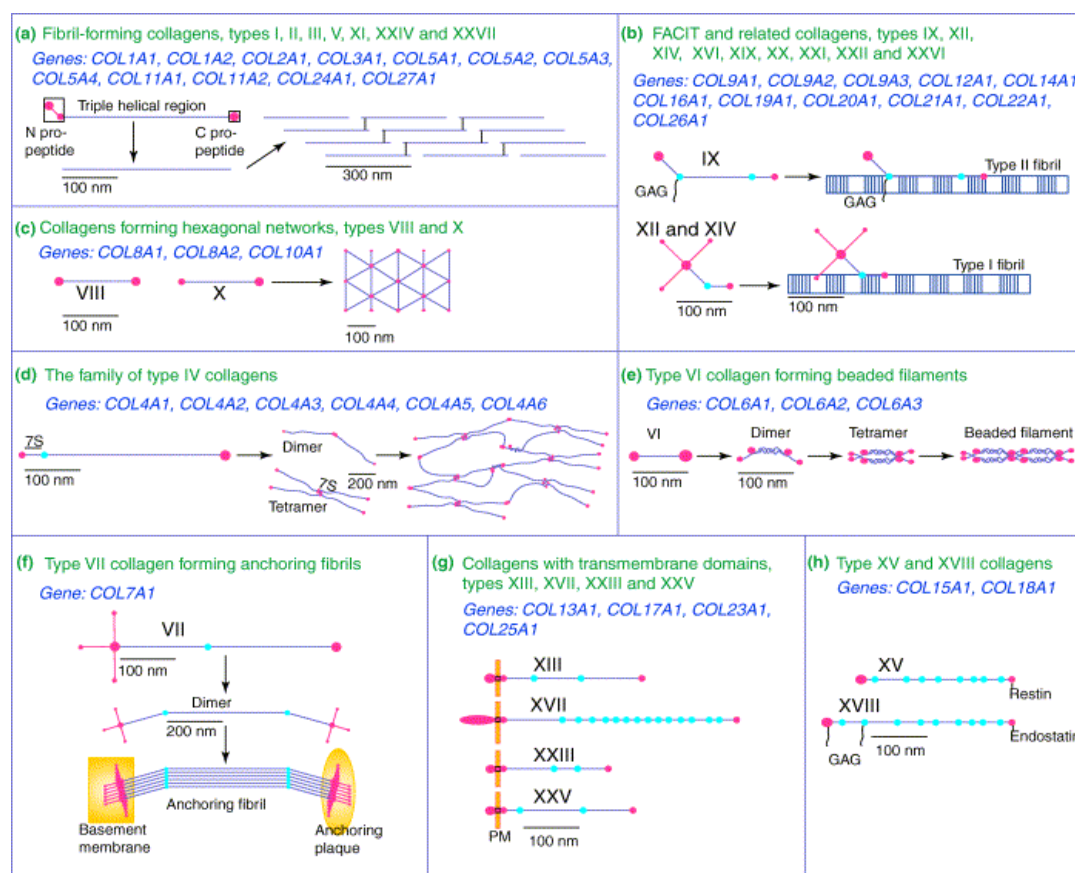


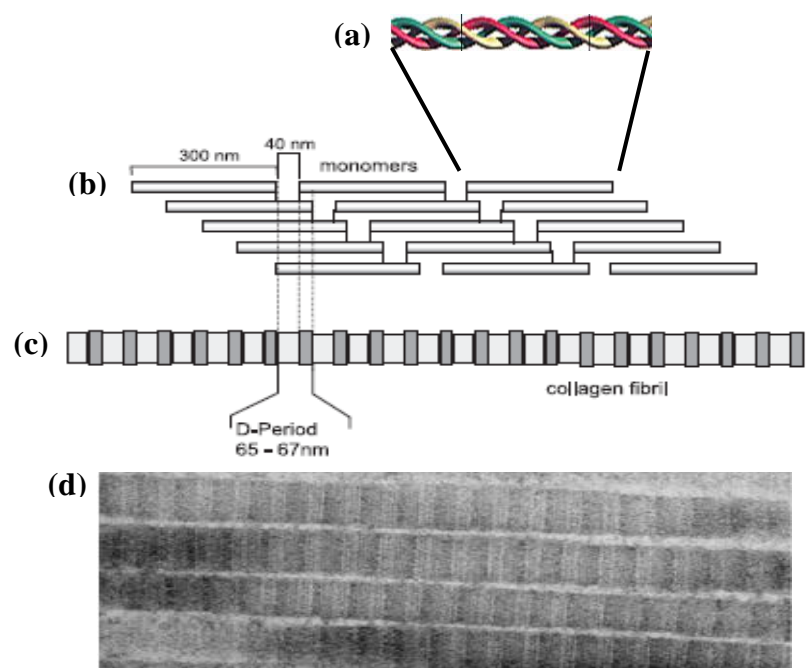
Fig 5. Membres de la superfamille des collagènes et leur assemblage supramoléculaire.

La superfamille des collagènes peut être divisée en neuf familles distinctes sur base de particularités de ses membres et de leur assemblage supramoléculaire : (a) **collagènes fibrillaires** ; (b) collagènes contenant des interruptions dans leur domaine en triple hélice et associés aux collagènes fibrillaires (**FACIT**) ; (c) collagènes formant des **réseaux hexagonaux** ; (d) **famille des collagènes de type IV**, présents in vivo au niveau des membranes basales ; (e) **collagènes de type VI** ; (f) **collagène de type VII** formant des fibres d'ancrage de la jonction dermo-épidermique ; (g) **collagènes comprenant un domaine trans-membranaire** ; (h) **famille des collagènes XV et XVIII** précurseurs de molécules anti-angiogènes. Les chaînes polypeptidiques retrouvées dans les 27 types de collagène différents repris dans ce schéma sont codées par un total de 42 gènes, chaque molécule de collagène étant constituée de trois chaînes pouvant être identiques ou différentes. D'après Myllyharju et Kivirikko, 2004 [63]. Un nouveau membre de la famille des collagènes, le **collagène XXVIII**, a été récemment identifié. D'après Gordon et Hahn, 2010 [62].

Parmi les différentes sous-familles de collagènes, les collagènes fibrillaires sont de loin les plus abondants. Ils sont caractérisés par leur capacité à s'assembler sous forme de fibres orientées présentant, en microscopie électronique, une structure périodique typique d'environ 65 à 70 nm causée par l'arrangement étagé des monomères individuels (un monomère étant formé de trois chaînes α associées en triple hélice) (Fig. 6). Ces monomères peuvent être des homotrimères ou des hétérotrimères formés de deux ou trois chaînes différentes. Ainsi, le collagène de type I est le plus souvent formé par l'assemblage de deux chaînes $\alpha 1$ de type I et d'une chaîne $\alpha 2$ de type I $\{[\alpha 1 (I)]_2 \alpha 2 (I)\}$ alors que le collagène de type III $\{[\alpha 1 (III)]_3\}$ ne contient qu'un seul type de chaîne. Dans le derme, les faisceaux de collagène sont essentiellement formés de collagène de types I, III et V (par ordre décroissant d'abondance) auxquels sont associés des collagènes moins abondants de type « FACIT » (types XII et XIV). Les faisceaux de fibres constitués majoritairement de collagène de type I sont plus épais et se trouvent surtout dans le derme réticulaire alors que ceux ayant une plus grande proportion de type III sont plus fins et surtout présents dans le derme papillaire ainsi qu'autour des vaisseaux sanguins.

Fig. 6 : Représentation schématique de l'assemblage supramoléculaire de fibrilles de collagène.

Les monomères de collagène (a) ont une longueur de 300 nm et sont séparés les uns des autres par des intervalles d'environ 40 nm (b). Cet arrangement est à l'origine de l'apparence striée caractéristique des fibres de collagène en microscopie électronique (c) et (d). D'après Gelse et al, 2003 [61].



I.1.2.4. L'hypoderme

L'hypoderme est la couche la plus profonde de la peau. Absent au niveau des paupières, des oreilles et des organes génitaux masculins, l'hypoderme est la continuité, sans limite franche, du derme. Il est constitué de lobules graisseux séparés par des septa conjonctifs interlobulaires servant de passage aux vaisseaux et aux nerfs destinés au derme [5]. On estime qu'environ 50 % de la masse graisseuse du corps humain est immobilisée dans l'hypoderme, soulignant

ainsi son rôle de stockage énergétique [2]. L'hypoderme joue aussi un rôle de thermorégulation et de protection en amortissant les agressions mécaniques.

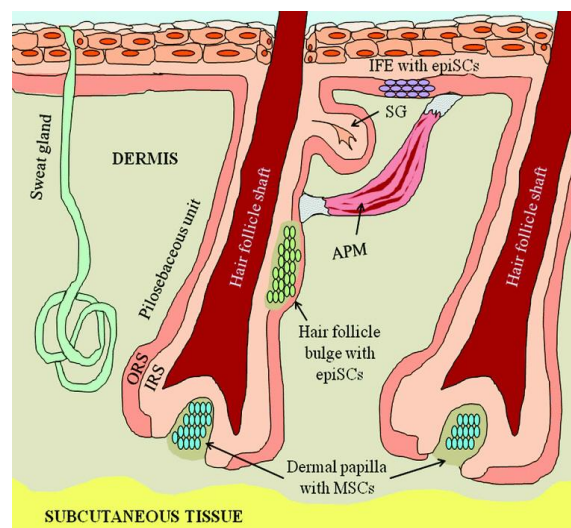
Les cellules les plus abondantes de l'hypoderme sont les adipocytes, cellules rondes remplies d'acides gras et de triglycérides comprimant le noyau contre la membrane plasmique [2]. On y retrouve également des fibroblastes, des macrophages, les cellules endothéliales formant les vaisseaux sanguins et des cellules nerveuses (corpuscules de Pacini) sensibles à la pression [29]. Le tissu graisseux est une source importante de cellules souches.

I.1.3. Les annexes cutanées

Les annexes cutanées sont essentiellement les poils, les glandes sébacées et sudoripares et le muscle arrecteur du poil (Fig. 7).

Fig. 7 : Représentation des annexes cutanées.

Le poil et ses gaines, le muscle arrecteur (APM) et la glande sébacée forment ensemble le follicule pilo-sébacé. La partie sécrétoire de la glande sudoripare (sweat gland) est enroulée dans le derme et son canal excréteur débouche sur un pore à la surface de la peau. Les niches de cellules souches résidentes participent à la régénération cutanée en cas de lésion. IFE : épiderme interfolliculaire; epiSCs : cellules souches épidermiques; SG : glande sébacée; MSCs : cellules souches mésenchymateuses; ORS : gaine épithéliale externe; IRS : gaine épithéliale interne. D'après Ko et al., 2010 [64].



La hampe du poil est localisée à l'intérieur d'invaginations épidermiques pénétrant le derme et l'hypoderme. Sa base est en contact avec la papille dermique et elle grandit à partir de follicule pileux [5]. Cette papille ainsi qu'une petite structure renflée de la gaine interne (« bulge ») sont des niches de cellules souches, respectivement mésenchymateuses et épidermiques participant à la régénération de la peau en cas de lésion [23]. Les poils sont composés de kératines dures, principalement les 6, 16 et 17 [30].

En règle générale, **les glandes sébacées** sont annexées aux poils, l'ensemble constituant les follicules pilo-sébacés [2, 5]. Elles sécrètent du sébum qui a pour fonction de lubrifier et d'imperméabiliser l'épiderme. **Les glandes sudoripares**, présentes dans le derme profond, sécrètent par exocytose la transpiration à la surface de la peau par l'intermédiaire des canaux excréteurs. En s'évaporant, la transpiration permet de réduire la température corporelle.

Le muscle arrecteur du poil est un petit muscle lisse tendu qui longe la face externe de la glande sébacée [2]. Sa contraction sous l'effet du froid, de la peur ou autres stimuli provoque une saillie du poil qui se verticalise donnant à la peau un aspect de « chair de poule » [2, 5].

I.1.4. RESEAUX VASCULAIRES SANGUIN ET LYMPHATIQUE

Comme tout épithélium, l'épiderme n'est pas vascularisé. Il est nourri par des substances diffusant librement à travers les capillaires des papilles dermiques [1]. Le derme et l'hypoderme sont en revanche richement vascularisés par un réseau très systématisé d'artérioles de moyen puis petit calibre, de capillaires et de veinules [2, 65]. À la partie profonde de l'hypoderme, les artères forment un premier réseau anastomotique parallèle à la surface cutanée. De celui-ci partent perpendiculairement des branches qui traversent l'hypoderme, en donnant des collatérales destinées à vasculariser les lobules graisseux et les annexes [66]. Ces branches se réunissent à la partie profonde du derme réticulaire pour former un second réseau anastomotique dont les mailles sont parallèles au premier et à la surface cutanée. De ce deuxième réseau partent perpendiculairement des artérioles responsables à la fois de l'irrigation des annexes cutanées et du derme réticulaire mais aussi de la formation d'un troisième réseau anastomotique à la jonction derme papillaire-derme réticulaire. De ce dernier réseau partent des capillaires qui gagnent les papilles dermiques [66]. Le réseau veineux est calqué sur le modèle artériel.

Les lymphatiques naissent par une anse borgne du sommet des papilles dermiques et suivent le trajet du réseau veineux. Les vaisseaux lymphatiques jouent un rôle important dans la régulation de la pression interstitielle et les réactions immunitaires [1].

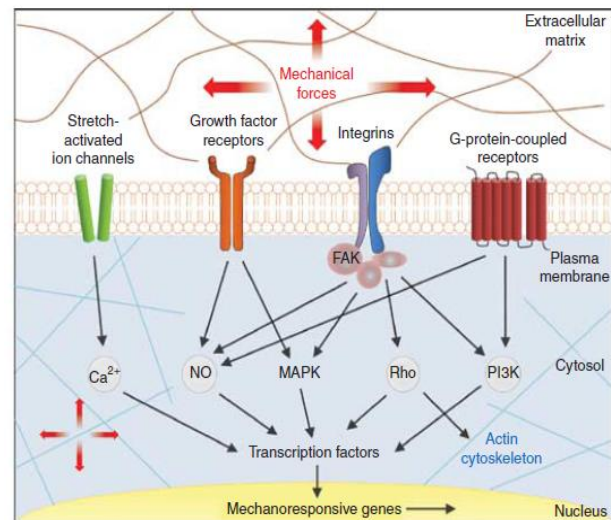
I.1.5 LES INTERACTIONS CELLULES – MATRICE EXTRACELLULAIRE

Au cours de leur existence, les cellules doivent répondre de façon appropriée aux différents facteurs biochimiques et physiques constituant leur environnement extracellulaire. A cette fin, elles disposent à leur surface de différents réseaux de récepteurs spécifiques capables notamment de lier des facteurs diffusibles (facteurs de croissance, cytokines), des molécules associées aux membranes des cellules adjacentes (interactions cellule-cellule) ou des composants de la MEC (interactions cellule-MEC) (Fig. 8) [67-69]. Les constituants matriciels (collagène, fibronectine, vitronectine, laminine,...) participent de façon majeure à la régulation cellulaire en interagissant avec des récepteurs spécifiques, principalement les intégrines [70]. Celles-ci sont des récepteurs hétérodimériques transmembranaires capables de lier des composants spécifiques par leur domaine extracellulaire alors que leur domaine

intracytoplasmique s'associe à des protéines adaptatrices, à des kinases, dont la FAK, et à des composants du cytosquelette pour former des complexes d'adhésion focale [71, 72]. L'activation de la voie matrice-intégrines-complexes d'adhésion focale est d'une importance primordiale pour la plupart des cellules, dont les fibroblastes et les kératinocytes. En plus des intégrines, d'autres structures membranaires capables de répondre aux stimuli physico-chimiques de la MEC ont été décrits et comprennent les canaux ioniques, les récepteurs de facteurs de croissance et les récepteurs couplés aux protéines G [73].

Fig. 8 : Interactions cellules – matrice extracellulaire.

Les complexes et structures membranaires sensibles aux propriétés physico-chimiques de la MEC sont les canaux ioniques, les récepteurs de facteurs de croissance, les récepteurs couplés aux protéines G et les intégrines. En réponse aux stimuli physiques et chimiques de la MEC, ils induisent une activation de multiples voies de signalisation intracellulaire, notamment les voies MAPK, RhoGTPases et PI3K. Ces différents signaux convergent vers l'activation de facteurs de transcription et leur translocation vers le noyau pour réguler l'expression de nombreux gènes. D'après Wong et al., 2011 [73].



Ces différentes classes de récepteurs régulent des voies de signalisation intracellulaire (MAPkinases, RhoGTPases, signaux calciques, radicaux libres) fortement interdépendantes puisqu'elles partagent de nombreux médiateurs communs et sont également capables d'influencer leur niveau d'activation respectif (Fig. 8) [69, 70, 72, 74]. Par ailleurs, en raison de la colocalisation des intégrines avec des canaux ioniques, des récepteurs de facteurs de croissance ou des récepteurs couplés aux protéines G, les forces mécaniques peuvent potentiellement induire leur trans-activation indépendamment de leur ligand, ce qui illustre bien les subtilités et la complexité des signaux régulateurs émanant de la MEC [71, 73-76].

Les divers récepteurs pour les composants matriciels, ainsi que la composition et la structure de la MEC elle-même, ne sont pas de simples effecteurs mécaniques régulant l'attachement et la migration cellulaires mais se comportent au contraire en acteurs clés dans la plupart des processus affectant le devenir cellulaire (prolifération, différenciation, survie, synthèse protéique, ...) [70, 72]. Les interactions cellule-MEC renseignent la cellule sur son environnement, qu'il s'agisse de sa composition ou des tensions mécaniques qui s'y

développent, et permet en retour à la cellule de modifier la MEC en remodelant sa composition [68, 70, 77-80]. Les tensions mécaniques jouent un rôle crucial au cours du processus de cicatrisation [81]. Sous l'effet de médiateurs biologiques, tel le TGF- β plaquettaire, les fibroblastes dermiques se différencient en myofibroblastes exprimant l'actine musculaire lisse (α -SMA) et acquièrent des capacités contractiles résultant en une rétraction de la plaie [82, 83]. Cette rétraction a pour résultante une rigidité accrue du tissu cicatriciel qui, en retour, stimule l'expression de gènes fibrotiques et la prolifération cellulaire. Alors que ce processus est parfaitement régulé au cours de la cicatrisation normale, la perturbation non contrôlée de ce cycle est à la source de maladies fibroprolifératives. Par ailleurs, il est maintenant reconnu que la tension mécanique est capable d'induire le relargage de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires séquestrées dans la MEC mais aussi de mettre à jour des séquences cryptiques régulatrices de certains de ses constituants [73]. Ces observations mettant en lumière l'importance de la mécanotransduction dans les pathologies cutanées suggèrent qu'il serait opportun d'en tenir compte dans le développement de nouvelles thérapies médicales et chirurgicales.

I.2 LES PLAIES ET CICATRISATION CUTANEE

I.2.1 LES PLAIES

Une plaie se définit comme une rupture de l'intégrité de la peau caractérisée par une perte de substance cutanée plus ou moins importante. Sa prise en charge a pour but de favoriser la cicatrisation et d'en limiter les conséquences fonctionnelles et esthétiques. Diverses classifications en rapport avec le type lésionnel, la profondeur, le délai de cicatrisation et l'étiologie par exemple, permettent de caractériser la plaie, de prévoir son évolution et les risques de complication et de choisir, sur des bases objectives, le traitement le plus approprié. Une **coupure** est une division franche et linéaire des tissus causée par un objet tranchant et une **abrasion** est une plaie produite à la suite d'un frottement avec une surface plane parallèle à la peau. Une **piqûre** est une effraction tégumentaire punctiforme par un corps pointu. Lors de **lacérations**, la peau est déchirée, les marges de la plaie sont irrégulières, les lésions restent localisées au trajet de l'agent vulnérant. Les **plaies contuses** sont provoquées par un impact avec un objet dur et contondant. La peau et les tissus sous-jacents sont écrasés, étirés, arrachés ou déchirés, ce qui conduit à une dévitalisation et une nécrose. Ces écrasements sont en général liés à des chocs violents mais il peut aussi s'agir de compressions continues qui, localisées en un seul point, conduisent à la formation d'une nécrose en masse appelée **escarre**. Une **brûlure** est une nécrose tissulaire qui peut être d'origine thermique, électrique

ou chimique. La brûlure est caractérisée par son étendue et sa profondeur. Toutes ces plaies peuvent être ou non accompagnées de perte importante de substance [84].

Une plaie de **1^{er} degré** est superficielle et ne touche que l'épiderme. On parle de **2^d degré**, superficiel ou profond, en fonction des altérations causées au derme alors qu'une plaie de **3^{ème} degré** affecte l'épaisseur totale de la peau et éventuellement les tissus sous-jacents (muscles, os...) (Fig. 9). Cette dernière catégorie s'accompagne de la perte des annexes cutanées et d'une insensibilité totale à la douleur et à la pression suite à la disparition des terminaisons nerveuses cutanées. Compte tenu de la destruction totale des annexes cutanées et de l'épiderme, la réépithélialisation se fait à partir des marges de la plaie, plutôt qu'en foyers multiples à partir des follicules pileux comme c'est le cas dans les plaies du 2^d degré.

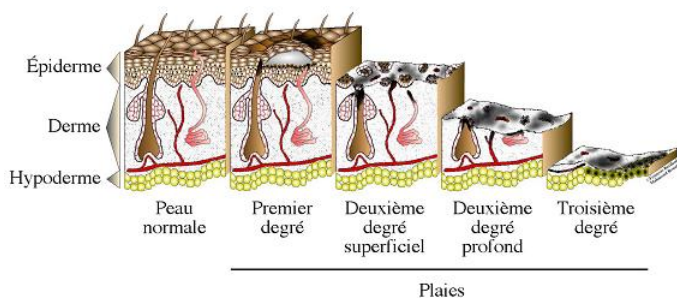


Fig. 9 : Classification des plaies en fonction de leur profondeur.

I.2.2 LE PROCESSUS NORMAL DE CICATRISATION

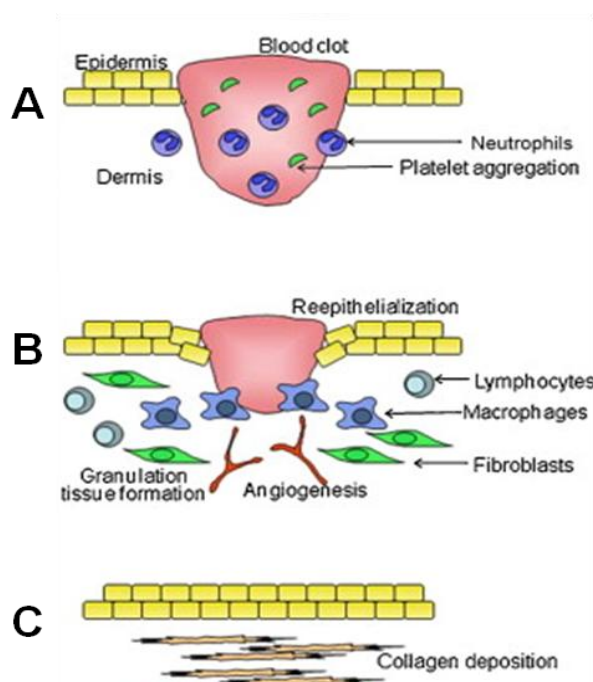
La capacité de réagir à une lésion et de réparer le tissu lésé est une propriété fondamentale des organismes multicellulaires [85]. La cicatrisation (Fig. 10) est un processus biologique qui permet de combler des pertes de cellules et de substance et d'aboutir à la réunion des berges de la plaie afin de restaurer la continuité de la peau ainsi que la majeure partie, voire la totalité, de ses fonctions originales [86]. Au cours de ce processus, plusieurs populations cellulaires différentes interagissent avec des médiateurs solubles (particulièrement les facteurs de croissance et les cytokines) et la MEC [86-88].

On distingue deux processus de cicatrisation : la régénération et la réparation [23]. On parle de régénération lorsque l'architecture originale et la structure de l'organe ou de la zone anatomique sont complètement restaurées [85]. Les tissus épithéliaux et endothéliaux sont aptes à se régénérer. Les plaies cutanées in utero chez le fœtus ont aussi la particularité de se régénérer sans formation de cicatrice, probablement dû à la présence de cellules peu ou pas différenciées, d'une forte proportion de collagène de type III dans les tissus et d'un environnement liquide stérile riche en facteurs de croissance et en MMPs. La présence de TGF- β 3, qui est un puissant facteur pro-cicatrisant, en lieu et place du TGF- β 1 a également

été évoqué [85, 87, 89-93]. Chez l'adulte, l'épiderme guérit par régénération, ce qui lui permet de récupérer sa structure et sa fonction initiale, tandis que le derme le fait par réparation. Cette réparation est caractérisée par une présence substantielle de tissu cicatriciel, voire d'une fibrose locale, à savoir un tissu conjonctif non spécifique ne présentant pas toutes les caractéristiques fonctionnelles que possédait la peau saine avant d'être lésée.

Fig. 10 : Représentation schématique des étapes de la cicatrisation.

Pendant l'hémostase, les plaquettes sanguines s'agrègent pour former le bouchon hémostatique fibrino-plaquettaire (A). La phase proliférative est caractérisée par une néoangiogénèse, la formation du tissu de granulation et la ré-épithélialisation (B). Au cours de la maturation du tissu cicatriciel, la matrice extracellulaire est remodelée et réalignée suivant les lignes de tension se développant dans le derme (C). D'après Kondo et Ishida, 2010 [94].



Bien que la cicatrisation soit un processus continu, trois phases sont classiquement décrites : les phases inflammatoire, proliférative et de remodelage ou de maturation (Fig. 11) [93, 95, 96]. Toutes trois sont interdépendantes et se chevauchent dans le temps [86, 87, 95, 97].

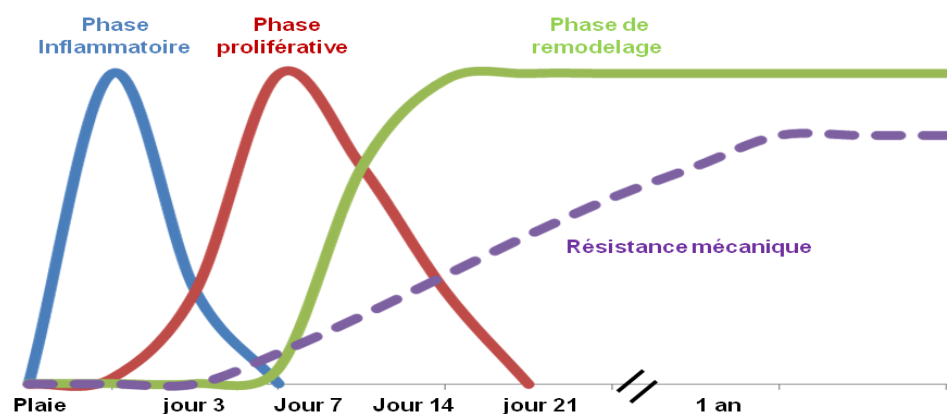


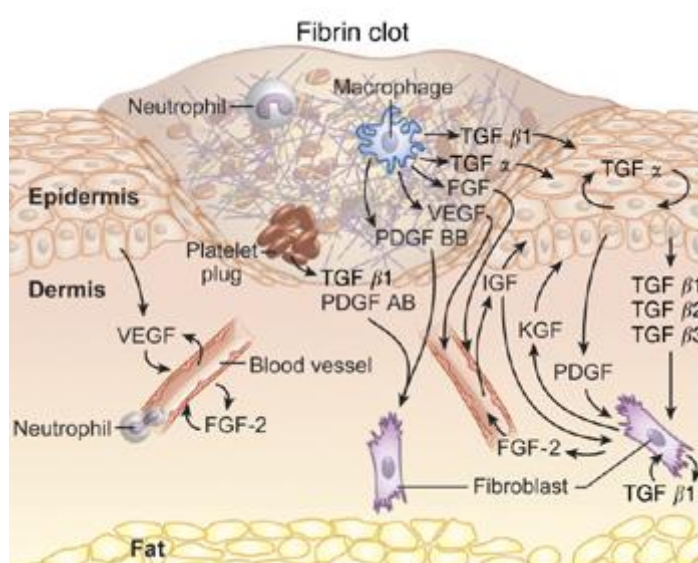
Fig. 11 : Chronologie des phases au cours du processus de cicatrisation et gain progressif de la résistance mécanique.

I.2.2.1 Phase inflammatoire

L'inflammation est un élément important de l'initiation de la réaction immunitaire innée qui débute immédiatement après la formation de la plaie [96]. Son déclenchement est la conséquence immédiate de la libération locale de constituants sanguins suite aux dommages causés au réseau vasculaire dermique (Fig. 12). Cette première phase peut être subdivisée en une phase précoce liée à la réponse hémostatique et une phase cellulaire plus tardive à caractère inflammatoire.

Fig. 12 : Les principaux acteurs de la phase inflammatoire.

Durant l'inflammation, les plaquettes sont libérées suite à la lésion vasculaire et activées. Le caillot formé sert à arrêter le saignement et permet, d'autre part, de constituer une MEC provisoire pour la migration des cellules pro-inflammatoires, dermiques et épidermiques au niveau du site lésé. Les plaquettes activées libèrent des facteurs de croissance, notamment le PDGF, le FGF-2 et les TGF- α et β . Ces facteurs, ainsi que différents produits de dégradation de la fibrine, attirent progressivement les neutrophiles et les monocytes/macrophages au niveau du site lésé. Ces cellules libèrent des enzymes protéolytiques, des cytokines pro-inflammatoires et d'autres facteurs de croissance, tels le TNF α , le VEGF, l'IGF, les TGF et le PDGF. Ces différents facteurs sont impliqués dans la modulation des différentes phases cellulaires de la cicatrisation. D'après Clark et al, 2009 [98].



I.2.2.1.a Réponse vasculaire et hémostase

Les plaquettes sanguines, premières cellules qui apparaissent sur le site lésé, jouent un rôle central dans l'hémostase [95, 99] en assurant la formation rapide d'un caillot de fibrine ou bouchon hémostatique fibrino-plaquettaire [92, 97]. Elles initient également les étapes suivantes de la cicatrisation en relargant au site lésionnel de nombreux facteurs de croissance tels le TGF- α , TGF- β et le PDGF [95]. En plus de son rôle hémostatique, le caillot de fibrine sert également de réservoir aux facteurs de croissance et assure un support provisoire permettant la migration des leucocytes, fibroblastes et cellules endothéliales qui afflueront dans un deuxième temps [92, 97, 99].

1.2.2.1.b Réponse cellulaire et inflammation

La réponse cellulaire de la phase inflammatoire est caractérisée par un afflux de leucocytes dans le site lésé. Ceux-ci sont attirés par les facteurs chimiotactiques qui sont initialement produits durant l'hémostase puis secrétés par les cellules envahissant la zone lésée, ce qui permet d'entretenir un recrutement cellulaire local. Les neutrophiles sont, dans un premier temps, les cellules majoritaires avant d'être progressivement remplacés par les monocytes/macrophages [99, 100]. L'infiltration des neutrophiles ne dure normalement que quelques jours, mais peut se prolonger et retarder la guérison en cas de contamination microbienne [99]. La disparition des neutrophiles vient clore la phase inflammatoire précoce. Le macrophage est considéré comme étant la principale cellule régulatrice de la phase inflammatoire. En effet, il permet d'éliminer les microorganismes, les débris tissulaires et les neutrophiles résiduels [86, 87, 96, 97], nettoyant ainsi la plaie (débridement) et la préparant aux phases suivantes de réparation. Les monocytes et macrophages sont également une source majeure de facteurs de croissance, incluant le PDGF, le FGF et le VEGF [87, 95, 96], qui sont essentiels pour le bon déroulement de la cicatrisation (Tableau 1). Les fibroblastes, attirés par des facteurs chimio-attractants produits par les macrophages, peuvent représenter jusqu'à 10 % de l'infiltrat cellulaire en fin de phase inflammatoire [97]. Les cellules endothéliales vasculaires sont également recrutées en fonction du gradient de facteurs angiogéniques produit par les macrophages en hypoxie.

Growth Factor/ Cytokine	Major source	Regulated wound healing events
EGF	platelets	epithelialization, fibroplasia, ECM production and degradation
TGF- α	macrophages, neutrophils, KC	epithelialization
HB-EGF	KC	KC migration
TGF- β	platelets, macrophages, KC, fibroblasts	fibroplasia, ECM production, contraction, leukocyte recruitment
HGF/SF	fibroblasts, KC	epithelialization, leukocyte recruitment, angiogenesis
FGF-1	KC	pleiotropic mitogen, angiogenesis
FGF-2	KC, fibroblasts, macrophages, endothelial cells	pleiotropic mitogen, angiogenesis, ECM production
KGF	fibroblasts	KC proliferation and differentiation
PDGF	platelets, macrophages, KC	fibroplasia, leukocyte recruitment, ECM production, contraction
VEGF	KC, macrophages	angiogenesis, vascular permeability
CTGF	platelets, fibroblasts	fibroplasia, ECM production, angiogenesis
IGF-1	fibroblasts, KC, plasma	epithelialization, ECM production
TNF- α	leukocytes, KC	expression of growth factors, leukocyte recruitment, ECM degradation
IL-1	leukocytes, KC	expression of growth factors, leukocyte recruitment, ECM degradation

Tableau 1 : Facteurs de croissance et cytokines impliqués dans la cicatrisation.

KC : kératinocytes ; ECM : matrice extracellulaire. EGF: Epidermal Growth Factor ; HB-EGF : Heparin Binding Epidermal Growth Factor; HGF/SF: Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor; KGF: Keratinocyte Growth Factor; CTGF: Connective Tissue Growth Factor; IGF-1: Insulin-like Growth Factor 1; IL-1: Interleukin 1.

I.2.2.2 Phase proliférative

Nombre de médiateurs biologiques produits au cours de la phase inflammatoire régulent la phase proliférative (Tableau 1). Celle-ci est marquée par la ré-épithélialisation, l'angiogénèse et la fibroplasie [85].

I.2.2.2.a Réépithélialisation

La ré-épithélialisation consiste en la régénération par les kératinocytes d'un nouvel épiderme qui recouvre la plaie et reforme une barrière protectrice contre l'environnement extérieur. Elle est d'autant plus rapide que la lame basale est intacte, par exemple dans les plaies du premier degré. Cette régénération induit de nombreux changements cellulaires qui débutent quelques heures après la blessure et se poursuivent jusqu'à la restauration d'un épiderme pleinement différencié, c'est-à-dire au-delà du simple recouvrement de la plaie. En réponse à la lésion cutanée, le premier processus mis en place lors de la ré-épithélialisation est la migration des kératinocytes sains issus des berges de la plaie et des éventuelles annexes cutanées résiduelles [97, 99]. Les cellules souches épithéliales, présentes dans la couche basale de l'épiderme et au niveau de follicules pileux, intègrent par ailleurs le néoépiderme et contribuent ainsi à sa capacité à se régénérer [92, 97, 101]. Les facteurs régulant la migration des kératinocytes sont principalement les interactions entre les intégrines et les constituants de la MEC (fibrine, fibronectine, vitronectine, tenascine C, collagènes de type I et III), les MMPs et les facteurs de croissance détaillés dans le tableau 1 [85-87, 91, 95, 97, 100]. Au cours de la cicatrisation, l'expression de diverses intégrines (principalement de la famille β_1 ($\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_9\beta_1$) mais aussi $\alpha_5\beta_{10}$, $\alpha_v\beta_6$, et $\alpha_v\beta_5$) est accrue, ce qui participe à la ré-épithélialisation en favorisant les interactions avec des constituants matriciels inhabituels (ou non-physiologiques) [92, 97, 102]. Les kératinocytes de l'épiderme en régénération élaborent également les éléments de la membrane basale, facilitant ainsi leur migration et contribuant à la reconstitution de la jonction dermo-épidermique. Cette synthèse matricielle est stimulée par l'EGF, le FGF et le TGF- β . Les kératinocytes sécrètent eux-mêmes de nombreux facteurs de croissance (Tableau 1) dans des quantités parfois supérieures à celles produites par les macrophages.

Au cours de la réépithélialisation, l'accroissement de la prolifération kératinocytaire est un élément clé pour assurer un approvisionnement en cellules migratoires et recouvrir la zone lésée [86, 99]. Cette hyperprolifération dépend essentiellement de facteurs de croissance présents dans la plaie (KGF, CTGF, TGF- α , EGF, HB-EGF, IGF-1, TNF- α , FGF-2 ...) mais aussi de la production de monoxyde d'azote (NO) [86, 90, 91, 97].

Lorsque la migration prend fin, probablement sous l'effet de contacts cellules-cellules inhibiteurs, les kératinocytes s'attachent fermement aux substrats sous-jacents et entament un processus de différenciation. On note ainsi l'apparition de couches distinctes de kératinocytes à différents stades de maturation, une réduction des espaces intercellulaires et de l'épaisseur de l'épiderme néo-formé, la reformation progressive d'une lame basale, l'établissement de jonctions intercellulaires et finalement la formation d'une couche cornée protectrice.

1.2.2.2.b Reconstitution du derme

La reconstitution du derme débute par la formation du tissu de granulation, approximativement 4-5 jours après la formation de la plaie. Elle est initiée en grande partie par les macrophages qui produisent continuellement des facteurs de croissance nécessaires à la stimulation des fibroblastes et à la formation de nouveaux capillaires sanguins qui bourgeonnent à partir des vaisseaux sanguins adjacents afin d'irriguer le tissu en cours de guérison [86, 87].

Fibroplasie

Les fibroblastes sont les cellules clés de cette étape de la cicatrisation. Ils proviennent des berges de la plaie ou résultent de la différenciation de cellules souches mésenchymateuses circulantes. Divers médiateurs solubles (FGF, PDGF, CTGF, EGF, TGF- β 1) induisent leur prolifération et leur migration dans le tissu de granulation nouvellement déposé [86, 87, 97, 99, 100]. La migration des fibroblastes est régulée par des processus de chimiotactisme mais est également conditionnée par une protéolyse limitée des composants matriciels afin de permettre le passage du corps cellulaire. Le gradient en motifs d'adhésion (haptotactisme) et l'arrangement tridimensionnel de la MEC sont deux autres mécanismes critiques régulant l'invasion fibroblastique. La fibronectine est à cet égard une protéine clé car elle contient de multiples domaines d'interaction avec d'autres macromolécules et avec des facteurs de croissance qu'elle immobilise dans la MEC. Elle offre par ailleurs, au niveau notamment d'un domaine caractérisé par la présence d'une séquence « RGD », un point d'ancrage pour de nombreuses intégrines exprimées à la surface cellulaire [99].

Après cette phase initiale, les fibroblastes changent progressivement de phénotype sous l'influence de divers facteurs de croissance dont le TGF β et le CTGF [95]. Ils se spécialisent dans la production de protéines matricielles qui vont contribuer à la formation du tissu de granulation [85, 86, 97, 99] ou tendent à se différencier en myofibroblastes, des cellules caractérisées par l'abondance de fibres de stress d'actine et leur capacité contractile, décrite en détail ci-dessous [87, 99, 103]. Une proportion de 30-50% de myofibroblastes présents

dans la plaie proviendrait des cellules souches mésenchymateuses [103-105]. La matrice formée à cette étape est structurellement et fonctionnellement plus proche du derme que la MEC provisoire initiale qu'elle remplace progressivement. Les fibres de collagène produites sont d'abord formées en majeure partie de collagène de type III. Par la suite, leur composition évolue et retourne à la « normale », avec une prépondérance de collagène de type I.

Contraction

La contraction de la plaie permet de réduire significativement la surface à réépithélialiser et la quantité de matrice conjonctive nécessaire à son comblement [92]. Le taux de rapprochement des bordures peut atteindre approximativement 0.6 à 0.75 mm/jour chez l'homme mais est bien plus rapide chez les animaux à peau mobile comme la souris [97]. La contraction débute 4-5 jours après la lésion et se poursuit pendant 2 semaines en fonction de l'environnement local et de la profondeur de la plaie [86, 97]. À titre d'exemple, la contraction peut réduire de plus de 40 % le diamètre initial de plaies profondes de 3° degré [99]. La contraction est largement tributaire de la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes sous l'influence de facteurs de croissance tels le PDGF, TGF- β 1, FGF, TNF- α 1, GM-CSF et le NGF [83, 97]. Les myofibroblastes se caractérisent par l'acquisition de fibres d'actine similaires à celles observées dans les cellules musculaires lisses. Ils sont les principaux responsables de la contraction du tissu de granulation [85, 87, 95]. L'expression des marqueurs de différenciation myofibroblastique (α -smooth muscle actine, desmine et chaîne légère de la myosine) débute au 6^e jour et atteint son maximum au jour 15 pour décroître progressivement ensuite [83, 86, 106, 107].

Néovascularisation

La néovascularisation, ou angiogénèse, se réfère à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir des vaisseaux préexistants adjacents à la plaie [86]. Les plaquettes et les monocytes/macrophages présents au site lésionnel produisent des facteurs angiogéniques et des enzymes qui, ensemble, entraînent une déstabilisation des jonctions intercellulaires et la dégradation locale de la membrane basale entourant les vaisseaux. Il s'ensuit une augmentation de la perméabilité vasculaire et du niveau d'expression de certaines intégrines endothéliales ($\alpha_v\beta_3$ principalement). Certaines cellules stimulées par des facteurs angiogéniques (notamment le VEGF et le FGF-2 par exemple) migrent en direction du site lésé, prolifèrent et s'organisent pour former de nouveaux vaisseaux [87, 91, 92, 95, 97, 99, 100]. Les cellules endothéliales activées sécrètent plusieurs facteurs (FGF-2, PDGF, IGF-1) dont l'action autocrine ou paracrine renforce la néovascularisation. Les fragments de dégradation de la matrice, la faible teneur en oxygène et les protéases présentes dans le milieu

extracellulaire régulent également le développement des nouveaux vaisseaux [87, 97]. Ceux-ci, orientés perpendiculairement à la surface de la plaie, fusionnent pour reconstituer un réseau capillaire anastomosé, recouvert par les péricytes et stabilisé grâce à l'interaction des cellules endothéliales entre elles et avec la lame basale qui entoure progressivement les néovaisseaux [86]. Cette néovascularisation est essentielle à la formation du tissu de granulation car elle en assure la perfusion.

I.2.2.3 Phase de maturation

La phase de maturation est la dernière et la plus longue du processus de réparation des plaies. Elle débute dès la formation du tissu de granulation et peut s'étendre sur plusieurs années. Elle concerne principalement la portion dermique de la cicatrice qui subit des réarrangements progressifs afin d'adapter au mieux ses propriétés aux sollicitations mécaniques et conditions physiologiques rencontrées localement. Cette maturation s'observe à différents niveaux.

I.2.2.3.a Remodelage de la MEC

Dans la peau humaine normale, les collagènes de type I et III représentent environ 75 % et 20% de collagène du derme, respectivement [97]. À l'inverse, le collagène de type III est le collagène principal synthétisé par les fibroblastes dans le tissu de granulation [89]. Cette synthèse débute 2 à 3 jours après la lésion et est maximale après 5 à 6 jours. Le tissu de granulation immature est également riche en acide hyaluronique et fibronectine. Pendant un an, voire plus, le derme va graduellement se remodeler avec une dégradation du tissu de granulation immature par diverses protéases, dont des MMPs, et son remplacement par un tissu plus riche en faisceaux de collagène, où prédomine à nouveau le collagène de type I, et en fibres élastiques. Ces modifications s'accompagnent également d'un accroissement progressif du diamètre des fibres de collagène et de leur réorganisation dans l'axe des tensions cutanées avec pour conséquence directe une augmentation des propriétés mécaniques de la cicatrice [85, 97, 99]. Sa résistance à des forces de traction atteindra environ 40% de la résistance initiale après 1 mois de cicatrisation, et 75-80% au bout d'un an [86, 97, 99].

I.2.2.3.b Réduction de la densité cellulaire et régression vasculaire

En fin de processus de remodelage, les fibroblastes et myofibroblastes retrouvent un phénotype quiescent ou meurent par apoptose, ce qui réduit la cellularité du tissu cicatriciel. Cette étape est cruciale pour le bon déroulement d'une cicatrisation harmonieuse puisque la persistance d'une synthèse de collagène élevée et la présence continue de myofibroblastes

mènent à des pathologies fibroprolifératives comme les cicatrices hypertrophiques et kéloïdes, par exemple [87]. La phase terminale de cicatrisation est aussi caractérisée par un changement de la densité vasculaire [97]. Certains capillaires subissent une involution, impliquant la mort par apoptose des cellules endothéliales [85], tandis que d'autres deviennent des vaisseaux de plus grand diamètre, s'anastomosent et s'organisent en réseaux capables de recevoir un plus grand volume de sang.

I.2.2.4 Plaies chroniques

La vitesse de comblement d'une plaie et les qualités fonctionnelles et esthétiques du tissu cicatriciel sont toutes deux largement dépendantes de l'ampleur, de la durée et de la succession des différentes étapes de la cicatrisation. Plusieurs facteurs sont susceptibles d'interférer avec une ou plusieurs phases du processus et de mener à des plaies cutanées chroniques (ulcères) [84, 101, 108]. Ces facteurs peuvent être locaux, car affectant directement les caractéristiques de la plaie, ou relatifs à l'état de santé général du patient (Tableau 2).

Facteurs locaux	Facteurs systémiques
Oxygénation	Age et genre
Infection	Balance hormonale
Corps étrangers	Stress
Insuffisance veineuse	Ischémie
	Désordres métaboliques acquis ou héréditaires (diabète, obésité ...)
	Alcoolisme et tabagisme
	Immunodéficience : SIDA, cancer, radiothérapie, chimiothérapie
	Nutrition
	Médicaments : stéroïdes, glucocorticoïdes, anti-inflammatoires non stéroïdiens, chimiothérapie, AVASTIN TM (bevacizumab).

Tableau 2 : Facteurs affectant la cicatrisation. *D'après Guo et Dipietro, 2010 [101].*

Les retards de cicatrisation sont caractérisés par une période d'inflammation anormalement longue qui peut être liée à la présence de contaminations pathogéniques ou de corps étrangers ne pouvant être phagocytés et détruits. D'autres situations, tels que désordres métaboliques ou ischémies locales chroniques, modifient la population leucocytaire ou son profil d'expression de médiateurs solubles, ce qui conduit à une augmentation de la concentration en

facteurs pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF- α) et à un dérèglement de la balance entre les protéases et leurs inhibiteurs [91, 93, 96].

Alors que la lésion aiguë évolue suivant les étapes de cicatrisation décrites plus haut, la plaie chronique révèle de nombreux dysfonctionnements et évolue vers un état d'inflammation pathologique, avec pour conséquence un processus de guérison retardé et non coordonné, aboutissant à une cicatrice de mauvaise qualité fonctionnelle et esthétique [109]. Les plaies chroniques sont caractérisées par un dysfonctionnement leucocytaire, des dommages à l'ADN cellulaire par les radicaux libres, une angiogénèse réduite, une synthèse accrue de MMPs [101, 109] et une dégradation excessive des facteurs de croissance et des composants de la MEC [88, 110]. Les conséquences en sont multiples, comme la capacité réduite des kératinocytes à migrer, proliférer et assurer la fermeture de la plaie. Les propriétés des fibroblastes peuvent également être altérées. Ainsi, chez le patient diabétique, ils ne répondent que très faiblement aux facteurs de croissance (TGF- β 1, PDGF), affichent une baisse du niveau d'expression de récepteurs cellulaires ainsi qu'un affaiblissement des voies de signalisation qui en sont tributaires [111-113]. Bien que les plaies chroniques aient une étiologie complexe et multifactorielle, une ischémie est impliquée dans plus de 90 % des cas, qu'elle résulte d'une insuffisance veineuse ou artérielle, d'épisode prolongé de compression des tissus (escarres) ou soit secondaire à une pathologie systémique tel le diabète [114, 115].

La prévalence des plaies chroniques est estimée à 1% de la population des pays développés [114, 116]. Ce pourcentage devrait encore progresser en raison de l'accroissement de l'incidence du diabète, de l'obésité et du vieillissement de la population. Les ulcères à composante ischémique touchent environ 3-6 x 10⁶ de personnes dans les seuls Etats-Unis, parmi lesquelles 85% sont des personnes âgées de 65 ans et plus [109], pour un montant annuel estimé à plus de 3 milliards de dollars uniquement pour les soins médicaux et infirmiers [117]. Des chiffres bien supérieurs sont rapportés en Europe [118], sans doute en raison d'une meilleure prise en charge des patients. Ces estimations doivent en outre être revues à la hausse si l'on prend en considération les coûts relatifs au temps de travail perdu, à la baisse de productivité et à la revalidation [109]. Les ulcères et les complications qui en résultent (limitations fonctionnelles, infections, transformations malignes, amputations) affectent par ailleurs considérablement la qualité de vie des patients, sur un plan physique, social, économique et psychologique [119].

La cicatrisation des ulcères est un processus lent comprenant de multiples phases de nécrose, d'inflammation, de bourgeonnement et d'épithélialisation. L'acte thérapeutique initial est le plus souvent un débridement, qui consiste à éliminer les débris et le tissu nécrosé, afin de

limiter l'étape inflammatoire, de favoriser la colonisation de la plaie par les kératinocytes et d'accélérer sa fermeture. La plaie ainsi « assainie » est ensuite recouverte d'un pansement. A l'origine celui-ci était uniquement destiné à assurer une protection mécanique et à prévenir les infections. A l'heure actuelle, divers types de pansements aux propriétés spécifiques sont utilisés afin d'accélérer la guérison.

I.2.2.5 Les particularités du processus de cicatrisation chez la souris

Au cours de ce travail, nous avons eu recours à un modèle murin de plaie cutanée. Il importe donc d'en préciser quelques particularités par rapport au processus de cicatrisation cutanée chez l'homme tel que nous venons de le décrire (Tableau 3). Chez la souris comme chez l'homme la peau se compose de trois couches : l'épiderme, le derme et l'hypoderme. Des différences histologiques, anatomiques et physiologiques significatives sont toutefois remarquées et doivent être prises en compte lors de l'utilisation de souris comme modèles animaux. Des différences s'observent au niveau de l'épaisseur totale de la peau (0,4 mm chez les rongeurs contre 2-4 mm chez l'homme), l'épaisseur de l'épiderme (10 μm chez les rongeurs contre 60 μm à 1 mm chez l'homme), la densité des follicules pileux (1000/ mm^2 chez les rongeurs contre 25/ mm^2 chez l'homme), la structure vasculaire superficielle et l'adhésion aux tissus sous-cutanés, par exemple [120, 121]. Contrairement à l'homme chez qui les plaies guérissent principalement par formation du tissu de granulation et ré-épithélialisation, la cicatrisation chez la souris génère très peu de tissu de granulation et se fait essentiellement par contraction de la plaie. Le renouvellement de l'épiderme de la souris se fait en 8-10 jours [32]. Il a été précédemment montré que la peau de souris était nettement plus souple que celle de l'homme, ce qui est un paramètre important lorsque l'on examine l'environnement mécanique de la réparation des plaies [122].

En dépit de ces différences histologiques, les modèles de souris ont contribué de manière significative à la compréhension de la biologie de la peau notamment parce que les voies de signalisation contrôlant l'homéostasie, l'activation et la différenciation cellulaires sont largement similaires aux régulations observées chez l'être humain [34].

	Mouse	Human
Hair cycle	Approximately 3 weeks	Highly variable, region-dependent
Epithelial architecture	No rete ridges	Rete ridges present
Apocrine sweat glands	Not present in skin, extensive in mammary glands	Present in axilla, inguinal, and perianal skin regions
Biomechanical properties	Thin, compliant, loose	Thick, relatively stiff, adherent to underlying tissues
Hypodermal thickness	Hair cycle-dependent	Less variable
Subcutaneous muscle layer	Present throughout as panniculus carnosus	Present only in neck region as platysma
Major method of wound healing	Contraction	Granulation tissue formation and re-epithelialization

Tableau 3: Principales différences entre la peau de souris et celle de l'homme. D'après Wong *et al.*, 2011 [121].

I.3 LES PANSEMENTS

Les propriétés minimales requises pour un pansement sont sa stérilité et ses capacités à favoriser les échanges gazeux, exercer une isolation mécanique et offrir une barrière de protection vis-à-vis d'agressions bactériennes. Des qualités supplémentaires sont un confort maximal pour le patient, un coût réduit, la capacité d'absorber l'excès d'exsudat éventuellement produit dans la plaie et de favoriser la cicatrisation avec un minimum de soins infirmiers [123]. Il existe de nombreux types de pansements répondant aux différentes phases de la cicatrisation, au degré d'exsudation et, dans une très faible mesure, à l'étiologie de la plaie. Ils peuvent être classés en différents types sur base de leur(s) fonction(s) (protection, détersion, antibactérien, occlusif, absorbant, humidifiant, adhérent, antalgique), du type de matériau utilisé (coton/tissu, collagène, hydrocolloïdes, alginate) ou de la forme physique (crème, gel, film, compresse) [108]. D'autres critères de classification permettent de distinguer les pansements « passifs », « interactifs » et « bioactifs ».

- Les pansements « passifs » ou traditionnels incluent le coton hydrophile et des bandages fabriqués à base de polymères naturels (cellulose) ou synthétiques (polyamide). Ils sont secs et ont pour but d'absorber l'exsudat et de protéger la plaie mais ne stimulent pas la cicatrisation [108]. Il faut les remplacer régulièrement pour éviter la macération. Un de leurs avantages indéniables est leur faible coût.
- Les pansements « interactifs » sont perméables aux vapeurs d'eau et à l'oxygène mais imperméables aux bactéries. Ils ont pour but de garder une humidité contrôlée, en absorbant le liquide excédentaire ou en réhydratant la plaie lorsqu'elle s'assèche, permettant ainsi une guérison plus rapide.

- Les pansements « bioactifs » délivrent une ou plusieurs substances actives préalablement ajoutées. Ils peuvent également posséder une activité endogène, notamment lorsqu'ils contiennent ou sont formés de cellules [98, 124-126].

Les pansements peuvent assurer plusieurs fonctions ou être utilisés en association pour optimiser leur efficacité. Nous présenterons ici quelques types de pansements en spécifiant l'intérêt de leur utilisation.

I.3.1 LES PANSEMENTS INTERACTIFS

I.3.1.1 Les hydrogels

Les hydrogels (Nu-Gel®, Intrasite Gel®, Urgohydrogel®, Hydrosorb®, Duoderm Hydrogel®), composés en majeure partie d'eau (entre 77 et 90%), sont formés par gélification de diverses substances hydrophiles (carboxyméthylcellulose, alginate de calcium, pectine, polyvinylpyrrolidone, polypropylène glycol, gomme xanthane,...). Ils concourent à la détersion des plaies sèches, fibrineuses et nécrotiques, aident à la cicatrisation des plaies non exsudatives et au ramollissement des plaques de nécrose. Ils nécessitent souvent un pansement secondaire, comme un film, pour maintenir une humidité suffisante au niveau de la plaie [108, 127].

I.3.1.2 Les hydrocolloïdes

Les hydrocolloïdes (Comfeel®, Duoderm®, 3M Tegaserb®, Cutinova Hydro®, Askina hydro®) comptent parmi les pansements les plus utilisés. Ils sont essentiellement constitués d'un polymère absorbant, la carboxyméthylcellulose (CMC), et éventuellement de gélatine, d'élastomère, de polyisobutylène ou de pectine. Ils favorisent un « hyper-bourgeonnement » et la cicatrisation naturelle en maintenant un milieu humide adéquat sur la plaie et en drainant les exsudats. Ils sont capables d'absorber un volume d'exsudat équivalent à trois fois leur poids. Les hydrocolloïdes se transforment au contact de la plaie en un gel malodorant en dehors de toute infection [108, 127].

I.3.1.3 Les hydrocellulaires

Les hydrocellulaires (Tielle®, Allevyn®, Cellosorb Urgo®), à base de polyuréthane, permettent d'éviter les inconvénients des hydrocolloïdes tout en absorbant et maintenant un milieu humide. Ils ne se délitent pas au contact de la plaie, ne dégagent pas d'odeur désagréable et sont capables d'absorber un volume d'exsudat équivalent à dix fois leur poids. Ils sont constitués de 3 couches : un film semi-perméable externe, un compartiment interne

constitué de mousse de polyuréthane chargé d'absorber les exsudats et d'assurer une protection mécanique efficace et enfin une couche de contact non adhérente [108].

I.3.1.4 Les alginates et les hydrofibres

Bien que de composition différente, ils sont regroupés dans la même classe de pansements, en raison de leur capacité d'absorption très importante et supérieure à celle des hydrocolloïdes et hydrocellulaires. Ils se présentent sous forme de compresses, qui se transforment en gel au contact des exsudats. Les alginates sont des extraits d'algues marines très absorbants (10 à 15 fois leur poids) et possédant des vertus hémostatiques. Ils favorisent une détersion de la plaie et contrôlent la prolifération bactérienne par piégeage physique. Ils sont purs (Algostéril®, Sorbalgon®) ou associés à de la carboxyméthylcellulose (Comfeel Seasorb®, Urgosorb®, AskinaSorb®). Les hydrofibres (Aquacel®) sont des fibres de carboxyméthylcellulose (même composant que les hydrocolloïdes) absorbant jusqu'à 30 fois leur poids. Ces pansements dégagent une odeur désagréable identique à celle des hydrocolloïdes [108, 127].

I.3.1.5 Les interfaces et les films

Les interfaces (Jelonet®, Grassolind®, Vaselitulle®), encore appelées tulles, sont des pansements gras constitués d'une maille enduite de substance grasse non adhérente telle que la vaseline ou du silicone. Ils sont peu coûteux, pas absorbants, leur retrait est parfois douloureux et hémorragique avec un risque d'arracher les bourgeons. Ils sont généralement déconseillés. Leur association aux hydrocolloïdes appelé lipo-colloïdes (Urgotul®, Physiotulle®) permet de limiter ces inconvénients et de favoriser leur utilisation pour la protection des plaies superficielles en phase d'épidermisation.

Les films (Opsite®, TégaDerm®) sont composés de polyuréthane semi-perméable. Ils ne sont ni absorbants, ni adhérents à la plaie. Transparents, ils permettent un contrôle visuel de la plaie. Ils sont indiqués au stade d'épidermisation ou pour recouvrir les sutures [108, 127].

I.3.1.6 Les pansements au charbon et à l'argent

Les pansements au charbon (Carboflex®, Carbonet®, Alione®) sont composés de charbon végétal, qui est l'élément principalement actif. À l'exception de Carboflex®, ils sont peu absorbants. Ils limitent la prolifération bactérienne et retiennent les odeurs. Ces propriétés bactériostatiques peuvent être renforcées par leur imprégnation aux ions argentiques qui ont une activité anti-bactérienne à large spectre (Actisorb plus®). Ils sont indiqués pour les plaies fibrineuses, infectées, malodorantes telles les plaies chez les patients cancéreux ou diabétiques.

Peu adhérents et modérément absorbants, ils requièrent un pansement secondaire pour assurer l'absorption. Dans les pansements à l'argent, ce dernier est parfois utilisé seul (Acticoat®) mais le plus souvent associé au charbon, aux hydrofibres (Aquacel® Ag+), à l'acide hyaluronique (Ialuset® Ag+) ou à l'alginate (Release® Ag+). L'argent est aussi présent dans ces pansements sous forme de sulfadiazine argentique (Ialuset plus®, Allevyn®). Ils sont indiqués dans les plaies infectées ou à risque d'infection et sur une période courte (quelques semaines).

I.3.2 LES PANSEMENTS ET DISPOSITIFS MEDICAUX « BIOACTIFS »

Les pansements « bioactifs » ont pour but de favoriser directement la réparation cutanée et sont à considérer au sens large. Ils peuvent être classés en différents types.

I.3.2.1 Matrice tridimensionnelle ou excipient contenant des protéines/molécules purifiées

Il existe ainsi des crèmes ou dispositifs médicaux enrichis en facteurs de croissance (PGDF ; Regranex®), en régulateurs de protéases (Promogran®, Dermax®, Cellostart®), en vitamines ou en minéraux [108]. Leur usage a pour but de pallier un déficit local, que celui-ci résulte du déséquilibre leucocytaire ou soit secondaire à une augmentation de l'activité protéolytique locale.

I.3.2.2 Dispositifs contenant des cellules vivantes

Les cellules (kératinocytes, fibroblastes) peuvent provenir du patient lui-même (autogreffes) ou d'un donneur (allogreffes). Elles sont cultivées soit en feuillet, soit à la surface ou au sein d'une matrice constituée de matériaux biocompatibles. On peut les subdiviser en trois groupes sur base du type cellulaire utilisé: les équivalents épidermiques produits par culture de kératinocytes autologues sur une membrane biocompatible (Epicel®, EpiDex®), les équivalents dermiques (Dermagraft®, Transcyte®) issus de la culture de fibroblastes humains sur une matrice résorbable et enfin les équivalents composites contenant des éléments dermiques et épidermiques (Apligraf®, Orcel®) [98, 124-126]. Ces équivalents cutanés sont utilisés pour le soin des brûlures et des ulcères chez les diabétiques. Leur coût très élevé et leur efficacité limitée compromet leur commercialisation à grande échelle [128, 129]. Leur utilisation est aussi limitée par les contraintes de stockage et de manipulation, les risques de rejet ou de contraction du greffon, et le risque de transmission de maladies [98].

I.3.2.3 Les biomatériaux

Certaines macromolécules, en fonction de leur structure physico-chimique, sont capables d'interagir avec les cellules par l'intermédiaire de divers récepteurs et de réguler ainsi diverses propriétés cellulaires indispensables au cours du processus de cicatrisation (prolifération, migration ou différenciation par exemple). En raison de leur action sur des étapes clés de réparation cutanée, on considère généralement que de telles macromolécules pourraient être utilisées avec succès pour le soin de différents types de plaies chroniques indépendamment de leur étiologie. Parmi ces macromolécules utilisées pour le développement de pansements en raison de leur action pro-cicatrisante, on retrouve des composants de la MEC (collagène, acide hyaluronique, gélatine, élastine, fibrine) mais aussi d'autres polymères naturels (chitine et chitosane d'arthropodes ou de champignon) ou synthétiques (polyuréthane, acide polyglycolique, acide polylactique) [124, 125, 127, 128]. Hormis leur capacité à stimuler la cicatrisation, les principales qualités requises pour ces matériaux sont une biocompatibilité élevée, la possibilité d'une dégradation progressive et régulée in situ au cours du temps, mais surtout une sécurité totale d'utilisation en raison de l'absence de toxicité du composant (ou de ses produits de dégradation) et de risque de transmission de maladies. C'est pour cette dernière raison que l'usage de molécules purifiées ou produites à partir de tissus humains ou animaux est considéré avec la plus grande prudence.

Un biomatériau produit par « décellularisation » de la sous-muqueuse du petit intestin de porc est maintenant disponible (E.Z derm, OASIS Wound Matrix, Mediskin) [126]. Un de ses avantages est sa structure tridimensionnelle formée par différents types de constituants de la MEC. Son origine animale et sa composition, différente de celle de la peau, sont toutefois des freins à son utilisation en clinique.

I.3.3 AUTRES TRAITEMENTS DES PLAIES

Le système VAC (Vacuum Assisted Closure) est constitué de mousse stérile en polyuréthane parcourue par un drain d'aspiration, un film adhésif transparent, de réservoirs et d'un moteur d'aspiration programmable. Ce système aide à la cicatrisation par pression négative en deuxième intention dans les plaies en « impasse thérapeutique » [127].

L'asticothérapie ou larvothérapie, consiste en l'emploi d'asticots, ou larves, de la mouche verte *Lucilia Sericata* (Biobag®, BioFoam®) qui consomment les tissus nécrosés sans s'attaquer aux tissus sains. Elle connaît un regain d'intérêt depuis la découverte des propriétés cicatrisantes et désinfectantes de ces larves et l'apparition de résistance des germes aux antibiotiques. Elle est indiquée pour les plaies chroniques surinfectées, nécrotiques mais

humides [130]. Son emploi demeure cependant très limité, notamment en raison de réticences psychologiques des patients et du fait qu'on continue à penser que son intérêt se limite à un débridement efficace de la plaie.

I.3.4 QUALITE D'UN PANSEMENT « IDEAL » ET DE SES COMPOSANTS

Au vu des connaissances actuelles concernant la peau, sa cicatrisation et la problématique des ulcères, un pansement a priori « idéal » pourrait être imaginé. Il devrait être constitué à partir d'un composant peu onéreux, biocompatible, dont la traçabilité serait optimale et l'utilisation aisée et dépourvue de risque. Une qualité hautement souhaitée serait qu'il mime au mieux la structure tridimensionnelle et les propriétés rhéologiques de la peau, en particulier le derme, afin de moduler de la manière la plus appropriée le phénotype des cellules entrant à son contact et de favoriser ainsi une cicatrisation rapide et harmonieuse. Dans ce contexte, la possibilité de former un pansement composé de différentes couches possédant des propriétés spécifiquement adaptées à une fonction particulière serait un atout.

Comme il est peu probable qu'un biomatériau possède toutes ces qualités, sa bioactivation par des facteurs biologiques constituerait une approche alternative. Ces facteurs pourraient être des cytokines ou des facteurs de croissance stimulant la prolifération ou la différenciation des principaux types cellulaires impliqués dans la réparation de la peau. Ils pourraient également présenter des motifs d'adhésion cellulaire si le but recherché est la colonisation du biomatériau par les cellules du patient et son remodelage progressif.

C'est sur base de ces différentes considérations qu'avait été initialement imaginé notre projet de recherche concernant un nouveau pansement pour le soin des plaies chroniques et que le choix de ses futurs composants avait été effectué. Ils sont décrits ci-dessous.

I.3.5 CHITOSANE

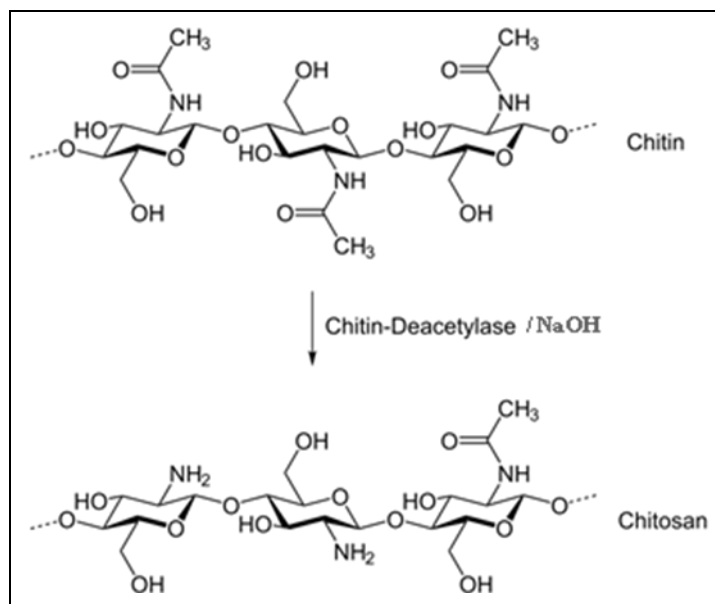
I.3.5.1 Propriétés du chitosane

La chitine est le polysaccharide naturel le plus abondant après la cellulose puisqu'elle est présente dans l'exosquelette de nombreux invertébrés (crustacés, mollusques, insectes) et dans la membrane cellulaire des algues vertes, des champignons et des levures [131-134]. Elle est composée de monomères de N-acétyl-D-glucosamine liés entre eux par une liaison de type β (1 – 4) (Fig 11) [135]. Sa déacétylation partielle, par réaction chimique ou enzymatique, produit du chitosane, un polysaccharide dont la composition est caractérisée par la répétition aléatoire d'unités D-glucosamine et N-acétyl-D-glucosamine (Fig. 13). De manière un peu empirique, on considère qu'un degré d'acétylation (DA) de 50 % marque la frontière entre

chitine (DA > 50%) et chitosane (DA < 50 %). Ce DA n'est pas seulement descriptif car il détermine les propriétés physicochimiques du polymère et influence sa vitesse de dégradation. Les chitosanes doivent donc toujours être définis en fonction de leur taille (entre 50 et 2000 kDa) et de leur DA. Ils possèdent des caractéristiques structurales similaires à celles de glycosaminoglycanes [136]. Alors que la chitine est insoluble dans les solvants aqueux, le chitosane peut être solubilisé en conditions acides (pH < 6) [132, 137, 138].

Fig. 13 : Structure chimique de la chitine et du chitosane

Le chitosane est produit par déacétylation partielle de la chitine par réaction chimique (NaOH) ou enzymatique (chitine déacétylase).



De nombreuses études concernant le chitosane ont montré ses activités anticholestérolémiantes, bactériostatiques, fongistatiques et hémostatiques [108, 131, 139-143]. Sa biocompatibilité et son affinité pour de nombreuses protéines supportent son intérêt en ingénierie tissulaire. Sa dégradation *in vivo* libère des monomères glucidiques qui peuvent être utilisés par l'organisme pour la formation de glycoprotéines et de glycosaminoglycanes [133].

I.3.5.2 Applications thérapeutiques actuelles du chitosane

Ces multiples propriétés biologiques expliquent pourquoi le chitosane a été évalué, sous différentes formes (billes, films, éponges, tubes, hydrogels, fibres, membranes), dans le cadre de diverses applications biomédicales et pharmaceutiques [132, 133, 139, 144-146]. A titre d'exemple, il a ainsi été suggéré qu'il puisse favoriser la cicatrisation, notamment lorsqu'il est associé à du collagène [137, 138, 147]. La commercialisation du chitosane dans le domaine médical reste toutefois limitée à ses formes non modifiées et principalement pour des applications liées à ses propriétés hémostatiques [148, 149] et bactériostatiques [134]. On

retrouve ainsi ces dispositifs médicaux sous forme de granule (CELOX®), de film, d'éponge (Hemcon®), de bande (TraumaStat®) et de matériau non-tissé (chitopack C®) [146].

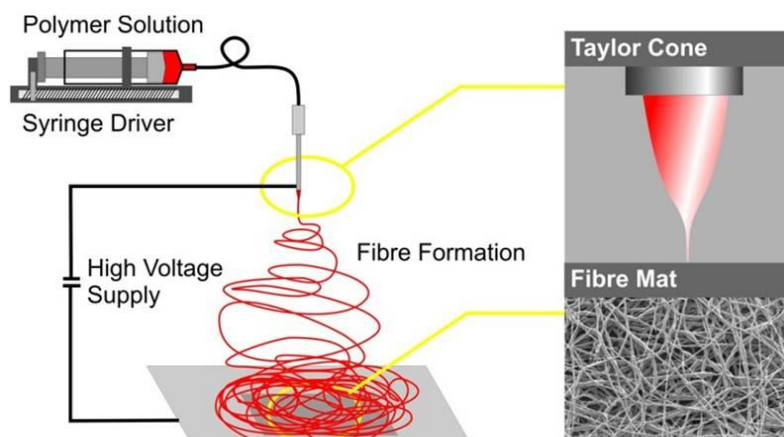
I.3.5.3 Nanofibres de chitosane

Afin d'améliorer ses diverses caractéristiques physico-chimiques et biologiques, le chitosane peut être modifié chimiquement ou associé à d'autres composants (minéraux, autres polymères, protéines) [132, 134, 137]. Alternativement, les améliorations peuvent porter sur sa mise en oeuvre. En effet, alors que les cellules *in vivo* sont en interaction avec un environnement tridimensionnel structuré par de multiples types de nanofibres, principalement du collagène dans le cas du derme, les pansements et dispositifs médicaux actuels sont sous forme de gel, de poudres ou de microfibres, à savoir des structures qui ne tiennent que peu en compte l'importance des interactions cellules-matrice extracellulaire tridimensionnelle.

Une méthode susceptible de permettre la production à grande échelle de fibres nanométriques de chitosane est l'électrofilage. Ce procédé, relativement simple et rapide, produit des fibres ultrafines et continues dont le diamètre peut être largement inférieur au micromètre (Fig. 14).

Fig. 14 : Schéma descriptif de l'électrofilage.

L'appareillage standard pour l'électrofilage se compose d'une filière (généralement une aiguille de seringue) connectée à la borne positive d'une source d'alimentation en courant continu haute tension, d'une pompe à seringue, et d'un collecteur connecté à la borne négative de la source d'alimentation. La seringue éjecte lentement la solution de polymère chargé électriquement. La forte tension électrique appliquée entre la goutte de solution présente à l'extrémité de l'aiguille et le collecteur induit la formation d'un « cône de Taylor » et l'éjection d'un filament nanométrique qui sèche rapidement par évaporation du solvant au cours de son trajet vers le collecteur. Comme ce processus est continu on obtient ainsi progressivement la formation d'un tapis de nanofibres.



L'électrofilage nécessite une forte tension électrique (supérieure à 30 kV) pour transformer un fluide de polymère en un fin filament, les électrodes positive et négative étant respectivement connectées à la seringue contenant la solution et au collecteur de fibres [134, 150]. Les nanofibres produites par électrofilage sont utilisées dans des applications industrielles (filtres,

textiles, capteurs) et, plus récemment, biomédicales notamment en ingénierie tissulaire [151, 152]. Malgré sa faible viscosité et son caractère polycationique en milieu acide, le chitosane peut être néanmoins électrofilé [151, 153].

I.3.6 LES MEDiateurs BIOLOGIQUES

Les différentes étapes de la cicatrisation sont régulées par de nombreux facteurs de croissances et cytokines. Il est bien évidemment impossible de reconstituer un milieu « pro-cicatrisant » contenant l'ensemble de ces différents facteurs à leurs concentrations optimales. Il est toutefois raisonnable de penser que l'usage de quelques facteurs clés ciblant les principales cellules impliquées dans la réparation cutanée serait susceptible d'apporter une amélioration de la cicatrisation des plaies chroniques. Concernant les trois facteurs de croissance mentionnés ci-dessous, on peut schématiquement considérer que le VEGF et l'HB-EGF sont des facteurs essentiels pour, respectivement, les cellules endothéliales et les kératinocytes. Quant au FGF-2 il est impliqué dans la régulation de la prolifération et du phénotype à la fois des fibroblastes et des cellules endothéliales.

Vascular Endothelial Growth factor (VEGF)

Les VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) constituent une famille de facteurs de croissance produits à partir de cinq gènes distincts codant pour les VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et le placental growth factor (PlGF) [154-156]. Le VEGF-A est un acteur essentiel du processus d'angiogénèse. Il existe sous forme de plusieurs variants générés par épissage alternatif du pré-ARNm [155-158]. Ces différentes isoformes (VEGF₁₁₁, VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₄₈, VEGF₁₆₂, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₂, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆) ont un nombre d'acides aminés variant de 111 à 206 dans leur forme mature et se distinguent par des différences, parfois subtiles, de leurs propriétés biologiques. Les VEGF₁₆₅ et VEGF₁₂₁ sont les variants les plus abondants dans les tissus humains [159]. Le VEGF₁₁₁, récemment identifié et caractérisé dans notre laboratoire, présente deux particularités spécifiques : une résistance élevée à la dégradation par diverses protéases, dont la plasmine et les MMPs, et la capacité de diffuser plus librement dans les tissus que les autres variants, en raison de sa faible affinité pour les constituants de la MEC [157].

Les différents variants de VEGF-A modulent les fonctions cellulaires via deux récepteurs spécifiques possédant une activité tyrosine kinase: le VEGF-R1 (Flt-1) et le VEGF-R2 (KDR). Les héparane sulfates et les neuropilines agissent comme co-récepteurs et facilitent l'activation des récepteurs au VEGF [155]. Même si les variants de VEGF-A se lient au

VEGF-R1 avec 10 fois plus d'affinité qu'au VEGF-R2, c'est principalement ce dernier qui, par son activité tyrosine kinase, est responsable des effets du VEGF-A sur les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. L'hypoxie qui apparaît lors d'une lésion tissulaire, est l'inducteur principal de la synthèse du VEGF [99]. Le VEGF favorise la cicatrisation des plaies chroniques en augmentant la perméabilité vasculaire, l'afflux des cellules inflammatoires ainsi que la migration et la prolifération des cellules endothéliales pré-existantes [160-162]. Comme plusieurs autres facteurs angiogéniques incluant le FGF-2 et le PDGF-B, le VEGF voit son taux d'expression réduit dans les plaies induites expérimentalement chez les animaux diabétiques, ce qui justifie l'intérêt de son utilisation dans le cadre des études de cicatrisation des plaies chroniques [160, 162].

Fibroblast growth factor (FGF-2)

Les FGF (Fibroblast Growth Factor) forment une famille de facteurs de croissance impliqués notamment dans les processus d'angiogenèse, de réparation tissulaire et de développement embryonnaire [163]. Ils stimulent la migration, la prolifération et la différenciation des fibroblastes et cellules endothéliales. Chez l'homme, la famille FGF se compose de 22 membres dont les plus abondants sont les FGF-1 (FGFa) et FGF-2 (FGFb) qui présentent par ailleurs la particularité de ne pas contenir de peptide signal. Ils ne sont donc libérés qu'après dommage cellulaire ou par un mécanisme d'exocytose indépendant de la voie Golgi-réticulum endoplasmique [163, 164]. Les FGF régulent de nombreuses propriétés cellulaires par l'intermédiaire des récepteurs transmembranaires spécifiques au nombre de quatre chez l'homme (FGF-R1 à 4) [163-165].

Les FGF sont également capables de se fixer à l'héparine et aux héparane sulfates, ce qui accroît leur activité biologique en stabilisant le complexe ligand-récepteur. Les héparane sulfates membranaires (syndecans, glypican) sont des co-récepteurs indispensables à l'activité de FGF [166-168]. Dans la MEC, l'interaction des FGF avec les héparane sulfates permet leur protection contre la protéolyse et augmente leur biodisponibilité mais limite par ailleurs leur diffusibilité [166, 167]. L'une des fonctions du FGF-2 est de favoriser la prolifération des fibroblastes et des cellules endothéliales ainsi que leur organisation en vaisseaux sanguins. Le FGF-2 stimule le métabolisme de la MEC et accélère la cicatrisation cutanée chez le rat [169]. Utilisé avec une matrice de chitosane, le FGF-2 semble accélérer la cicatrisation d'ulcères de pression chez la souris [170].

Heparin Binding Epidermal Growth Factor (HB-EGF)

Le HB-EGF est un membre de la famille de l'EGF. Après libération dans le milieu extracellulaire par diverses métalloprotéases, notamment les ADAMs, il est capable de stimuler la croissance, la migration, la prolifération et la différenciation de nombreux types cellulaires [171]. A la différence de l'EGF, l'HB-EGF est capable de se fixer à l'héparine et aux héparane sulfates ce qui module son activité. Il est initialement synthétisé sous forme d'un précurseur transmembranaire (Pro-HB-EGF) qui est biologiquement actif et capable de stimuler la croissance des cellules voisines de façon juxtacrine. Bien que quatre récepteurs à l'EGF soient décrits (membre de la famille ErbB), seuls deux sont activés par le HB-EGF: les EGF-R1 et EGF-R4 [171].

I.3.7 PEPTIDES D'ADHESION

Ainsi que mentionné précédemment (point 1.5), les interactions entre les cellules et leur environnement sont des éléments essentiels qui régulent de manière directe et indirecte diverses fonctions cellulaires (adhésion, étalement, migration, survie, prolifération,...). Ces interactions s'opèrent par l'intermédiaire de récepteurs membranaires, dont diverses intégrines. Celles-ci présentent des affinités pour un ou plusieurs ligands ou pour différentes séquences en acides aminés (Fig. 15). C'est le cas notamment des intégrines capables de reconnaître la séquence tripeptidique "Arg-Gly-Asp" (RGD) présente dans plusieurs macromolécules de la MEC, dont la fibronectine. Ce motif minimal ainsi que d'autres peptides qui le contiennent, en particulier GRGDS (Gly-Arg-Gly-Asp-Ser), favorisent l'adhésion et l'étalement cellulaire lorsqu'ils sont présents au sein de la matrice extracellulaire [172, 173]. Dans ce contexte, l'immobilisation d'une telle séquence à la surface d'un biomatériau, et notamment le chitosane, devrait accroître significativement sa biocompatibilité et sa capacité à moduler et à orienter la différenciation cellulaire [174].

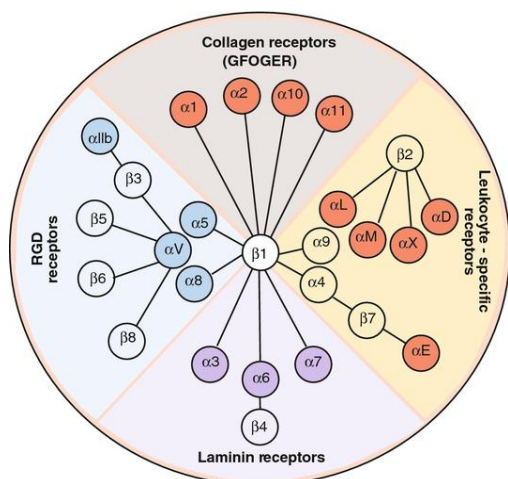


Fig. 15 : Classification des intégrines sur base de leur(s) ligand(s) préférentiel(s).

I. BUTS ET PLAN DU TRAVAIL

II. BUTS ET PLAN DU TRAVAIL

Le but à long terme de ce projet était de développer un nouveau type de pansement pour le soin des plaies cutanées chroniques. Sur base de la littérature concernant à la fois ce domaine biomédical particulier et celui des biomatériaux, notre choix initial s'est porté sur la réalisation d'un pansement formé de nanofibres de chitosane qui seraient par ailleurs susceptibles d'être bioactivées par immobilisation de médiateurs biologiques. Au cours de ce travail, réalisé en collaboration étroite avec d'autres équipes, la tâche de notre laboratoire était de caractériser les effets biologiques des composants du pansement, à la fois *in vitro* en culture cellulaire et *in vivo* chez la souris. Dans la suite de ce manuscrit, nos résultats seront regroupés en deux chapitres. Le premier, sous forme de publications scientifiques, portera sur l'étude du chitosane et de ses propriétés biologiques. Le second fera état de l'évaluation de l'activité biologique des molécules développées pour la bioactivation du chitosane. Chaque partie sera précédée d'une brève introduction et suivie d'une discussion spécifique. Une discussion générale permettra de situer nos résultats dans le contexte du traitement des plaies chroniques.

I. RESULTATS

III. RESULTATS

III.1 CHAPITRE 1 : BIOCOMPATIBILITE ET PROPRIETES BIOLOGIQUES DU CHITOSANE

Publication N°1: Development of a procedure to simultaneously isolate RNA, DNA, and proteins for characterizing cells invading or cultured on chitosan scaffolds. Tchemtchoua TV, Atanasova G, Aqil A, Maquet V, Jérôme C, Poumay Y, Colige A. *Anal Biochem.* 2009 Oct 1; 393(1): 145-7.

Introduction

Le chitosane, un dérivé déacétylé de la chitine, a une structure chimique similaire à celle de glycosaminoglycanes présents dans les tissus conjonctifs et possède de nombreuses propriétés biologiques justifiant son étude dans le cadre de multiples applications biomédicales [138, 139]. Des matrices de chitosane en 2-D et 3-D ont été largement utilisées pour des tests de culture cellulaire *in vitro* [175, 176]. Ces travaux se sont toutefois généralement limités à l'évaluation de l'adhésion et de la prolifération cellulaire, majoritairement de cellules transformées. Par ailleurs, ils ne fournissent le plus souvent aucune caractérisation moléculaire du phénotype des cellules adhérant à la matrice de chitosane ou des processus régulant cette interaction. Ce défaut d'analyses moléculaires est un frein au développement de dispositifs médicaux ou d'applications à base de chitosane. Il est notamment dû à l'absence de procédés efficaces permettant l'extraction et la purification d'ADN, d'ARN et, dans une mesure moindre, de protéines à partir de cellules ou de tissus en contact étroit avec du chitosane.

Le but de cette première partie du travail a été de remédier à ce problème technologique en mettant au point un procédé efficace qui permettrait, à partir d'un seul échantillon contenant des cellules cultivées en présence de chitosane, l'extraction et la purification de l'ADN, l'ARN et les protéines en trois fractions bien distinctes.

Résumé des résultats

Nos travaux préliminaires ont portés sur différentes procédures et kits commercialement disponibles utilisés pour l'extraction en routine d'ARN à partir de tissus ou de cellules en culture. Leur efficacité a été mesurée sur des échantillons consistant en un nombre donné de

cellules en présence ou en absence (contrôle) de chitosane. Pour tous les procédés testés, les rendements d'extraction d'ARN en présence de chitosane ne représentaient au maximum que 5% de ceux obtenus dans les conditions contrôles. Par ailleurs, les ARN obtenus étaient de mauvaise qualité.

Une nouvelle approche, basée sur la centrifugation à haute vitesse sur un coussin de chlorure de césium d'un échantillon préalablement lysé dans un tampon fortement chaotropique, a été évaluée et progressivement améliorée. Elle a permis de purifier l'ARN avec des rendements similaires en présence et en absence de chitosane. Par la suite, diverses mises au point ont permis, à partir d'un échantillon unique contenant du chitosane, de purifier et récolter séparément protéines, ADN et ARN, et cela de manière efficace et quantitative (Fig. 16). Les ARN et protéines extraits et purifiés ont été utilisés avec succès, respectivement pour des analyses par RT-PCR (Fig. 17A) et western blotting (Fig. 17B).

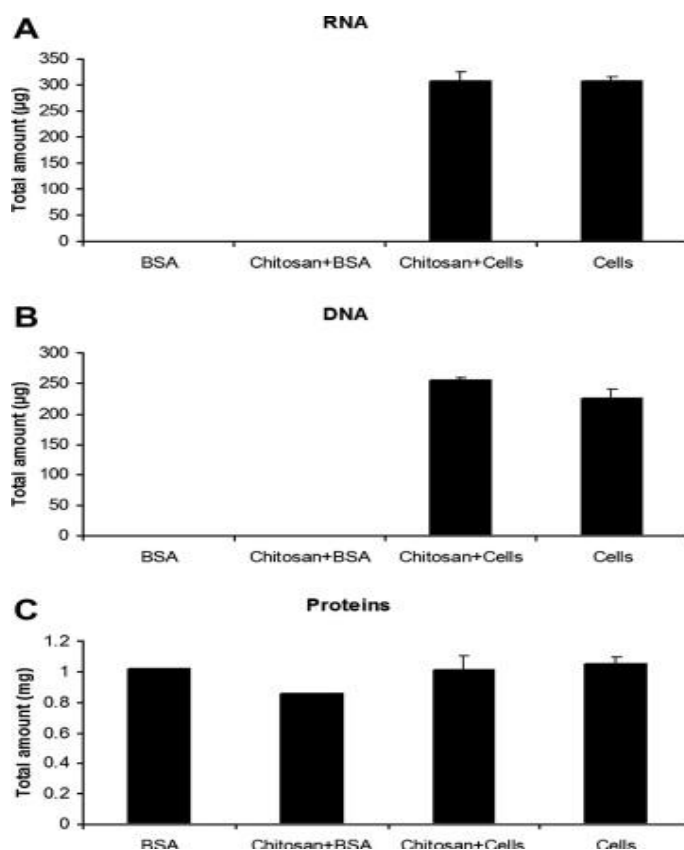


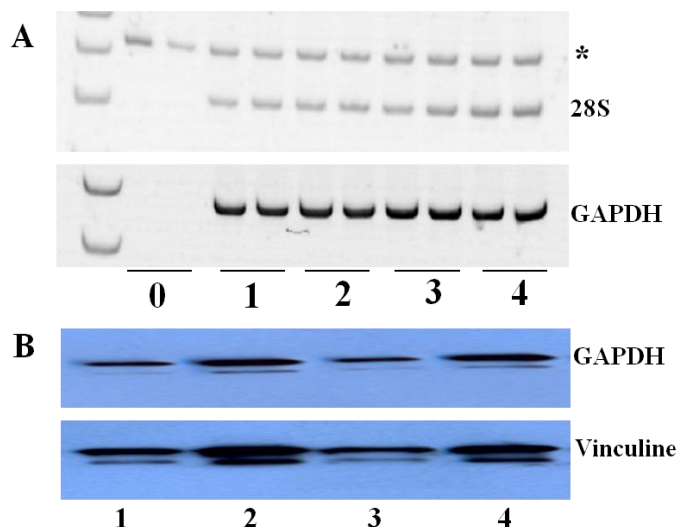
Fig. 16: Quantités totales d'ARN (A), d'ADN (B) et de protéines (C) purifiées par ultracentrifugation.

Les différents échantillons expérimentaux (BSA seule, BSA en présence de chitosane, cellules en présence de chitosane et cellules seules) ont été extraits en parallèle suivant une procédure identique. L'ARN, l'ADN et les protéines ont été récupérés et dosés. Le chitosane dans l'échantillon de cellules n'interfère pas avec la récupération quantitative de ces trois types de molécules.

Fig. 17: Analyse des produits purifiés par RT-PCR (A) et western blotting (B).

A. Des duplicats de cultures de cellules en présence de chitosane (1-2) et de cellules seules (3-4) ont été extraits et purifiés en parallèle, chaque échantillon d'ARN étant ensuite analysé en duplicat. Les ARN ont été amplifiés par RT-PCR en utilisant des amorces nucléotidiques spécifiques de l'ARNr du 28S et de l'ARNm de la GAPDH. Les produits d'amplification sont ensuite séparés sur gel d'électrophorèse. B. Les protéines isolées des mêmes cultures ont été soumises à une électrophorèse (SDS-PAGE) puis transférées sur une membrane de PVDF. Les analyses ont été réalisées grâce à des anticorps dirigés contre la GAPDH ou la

vinculine et une révélation à l'ECL. *: produit d'amplification d'un ARN synthétique servant de standard ajouté dans chaque tube de réaction ; 0: RT-PCR sur un échantillon contrôle sans ARN.



Discussion

Les travaux antérieurs de nombreux laboratoires souffraient d'un manque d'évaluation des effets biologiques du chitosane, en raison notamment de la difficulté à purifier de l'ARN à partir de cellules cultivées au contact de ce polymère. Ces constatations se sont confirmées au cours de ce travail lorsque nous avons testé toutes les procédures les plus couramment utilisées de nos jours. Ces problèmes résulteraient de l'apparition d'interactions électrostatiques. Il semblerait en effet qu'en présence de molécules fortement polyanioniques, tels l'ADN et les ARN, il y ait transfert de protons, à partir du tampon ou des fluides environnants, sur les glucosamines du chitosane. Cette protonation induite renforcerait ainsi la stabilité des complexes entre les acides nucléiques et le chitosane, devenu polycationique. Ce mécanisme explique pourquoi le chitosane est considéré comme une molécule d'avenir pour la délivrance de matériel génétique [177] mais aussi pourquoi il interfère avec la purification de l'ARN.

La nouvelle procédure mise au point a été développée sur base d'une technique d'ultracentrifugation sur coussin de CsCl établie de longue date et guère plus utilisée aujourd'hui. Elle permet l'utilisation d'agents chaotropiques puissants et de hautes forces ioniques, qui, ensemble, permettent de dissocier les complexes formés entre le chitosane et les acides nucléiques. Des améliorations technologiques ont, par la suite, permis de purifier à

partir d'un seul échantillon biologique, l'ADN, l'ARN et les protéines. Des études supplémentaires ont permis de vérifier la qualité respective de ces 3 fractions et de démontrer qu'elles sont adaptées à divers types d'analyses couramment utilisées en biologie cellulaire. Ce nouveau procédé permettra donc d'évaluer plus aisément et de manière plus précise les propriétés biologiques du chitosane et son intérêt dans le domaine de l'ingénierie tissulaire en médecine humaine.

Publication N°1

“Development of a procedure to simultaneously isolate RNA, DNA, and proteins for characterizing cells invading or cultured on chitosan scaffolds”.

Tchemtchoua VT, Atanasova G, Aqil A, Maquet V, Jérôme C, Poumay Y, Colige A.
Anal Biochem. 2009 Oct 1; 393(1): 145-7.



Notes & Tips

Development of a procedure to simultaneously isolate RNA, DNA, and proteins from characterizing cells invading or cultured on chitosan scaffolds

Victor T. Tchemtchoua^a, Ganka Atanasova^b, Abdelhafid Aqil^c, Véronique Maquet^d, Christine Jérôme^c, Yves Poumay^b, Alain Colige^{a,*}^a Laboratory of Connective Tissues Biology, GIGA Research Center, University of Liège, 4000 Sart Tilman, Belgium^b Cell and Tissue Laboratory, University of Namur (FUNDP), 5000 Namur, Belgium^c Center for Macromolecules Study and Research, Institut de Chimie, University of Liège, 4000 Liège, Belgium^d KitoZyme SA, Parc Industriel des Haut-Sarts, Zone 2, 4 rue Haute Claire, 4040 Herstal, Belgium

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 April 2009

Available online 16 June 2009

ABSTRACT

For many years, chitosan and its derivatives have been considered to be promising biomaterials for tissue engineering and repair. However, information regarding their biological effect on cell phenotype is usually limited to evaluation of cell proliferation and survival, overlooking proteomic and transcriptomic analysis. This is largely related to the lack of efficient and quantitative procedures for protein and nucleic acid purification from cells cultured on, or inside, chitosan scaffold. Here we describe an ultracentrifugation procedure enabling the simultaneous and quantitative recovery of high quality RNA, DNA and proteins from cells growing in close contact of biomaterial matrices containing chitosan.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Chitosan is a deacetylated derivative of chitin, a glucosamine-based polysaccharide abundant in the cell wall of fungi and the exoskeleton of crustaceans and insects. Besides numerous applications in the agroindustry, chitosan is considered as a very promising biomaterial in the pharmaceutical and medical fields due to numerous valuable properties such as biocompatibility, progressive degradability, absence of toxicity, and lack of allergenicity [1]. In addition, it can be easily manufactured in different forms (e.g., films, foams, fibers, hydrogels) or chemically modified for specific applications [2,3]. Many reports indicate that it could also be a valuable vehicle for cell transfection due to its capacity to interact with both nucleic acids and the cell surface. Surprisingly, experimental investigations of its biological properties *in vitro* and *in vivo* have led to conflicting results, for example, reporting that chitosan is a good [4] or poor [5] substrate for cell adhesion and that it favors or prevents cell proliferation. Such discrepancies can be partially explained by the diversity of chitosan (e.g., source, degree of acetylation, molecular weight) and cells (e.g., native or transformed, from various tissular origins such as keratinocytes, fibroblasts, and chondroblasts) used in those studies. Another explanation relates to the relative lack of information concerning the behavior of cells cultured on, or inside, the chitosan scaffold. Indeed, most studies report only evaluations of cell adhesion and proliferation without addressing more fundamental biological problems such as regulations operated by cell–matrix interactions and characterization of the biosynthetic phenotype of cells by pro-

teomic and transcriptomic tools. This is due largely to the fact that chitosan interferes with techniques required for protein analysis and with all of the procedures that are currently used for nucleic acids (i.e., RNA, DNA) purification. This major drawback also explains why this promising biomaterial is not yet widely used for clinical applications.

This study was initiated to solve this methodological problem by setting up a procedure that allows reliable simultaneous isolation of proteins, DNA, and RNA from any chitosan-based biomaterial scaffold containing cells.

During preliminary studies, various common reagents and kits for RNA purification were compared using experimental samples consisting of a fixed number of cells (5×10^5), alone or after mixing with chitosan (3 mg of KiOmedine–CsU [KitoZyme, Herstal, Belgium]), and a three-dimensional scaffold crushed at liquid nitrogen temperature to mimic real experimental conditions. For control samples without chitosan, similar amounts of RNA ($7.0 \mu\text{g}/5 \times 10^5$ L929 cells) were recovered with the different tested procedures (Table 1). Similarly, the purity of RNA, as assessed by its A_{260}/A_{280} absorbance ratio close to 2, was also comparable and highly satisfactory. The presence of chitosan, however, strongly affected the yield and the quality of the recovered RNA samples independent of the protocol used for the isolation (Table 1A), thereby explaining why the development of a more efficient tool was initiated. For this purpose, cell samples with or without chitosan were lysed (5 M guanidium thiocyanate, 25 mM sodium citrate [pH 7], 17 mM lauryl sarcosine, and 100 mM β -mercaptoethanol), homogenized, and cleared by centrifugation (16,000g, 3 min). Unsolubilized material was discarded, and the supernatant was loaded

* Corresponding author.

E-mail address: acolige@ulg.ac.be (A. Colige).

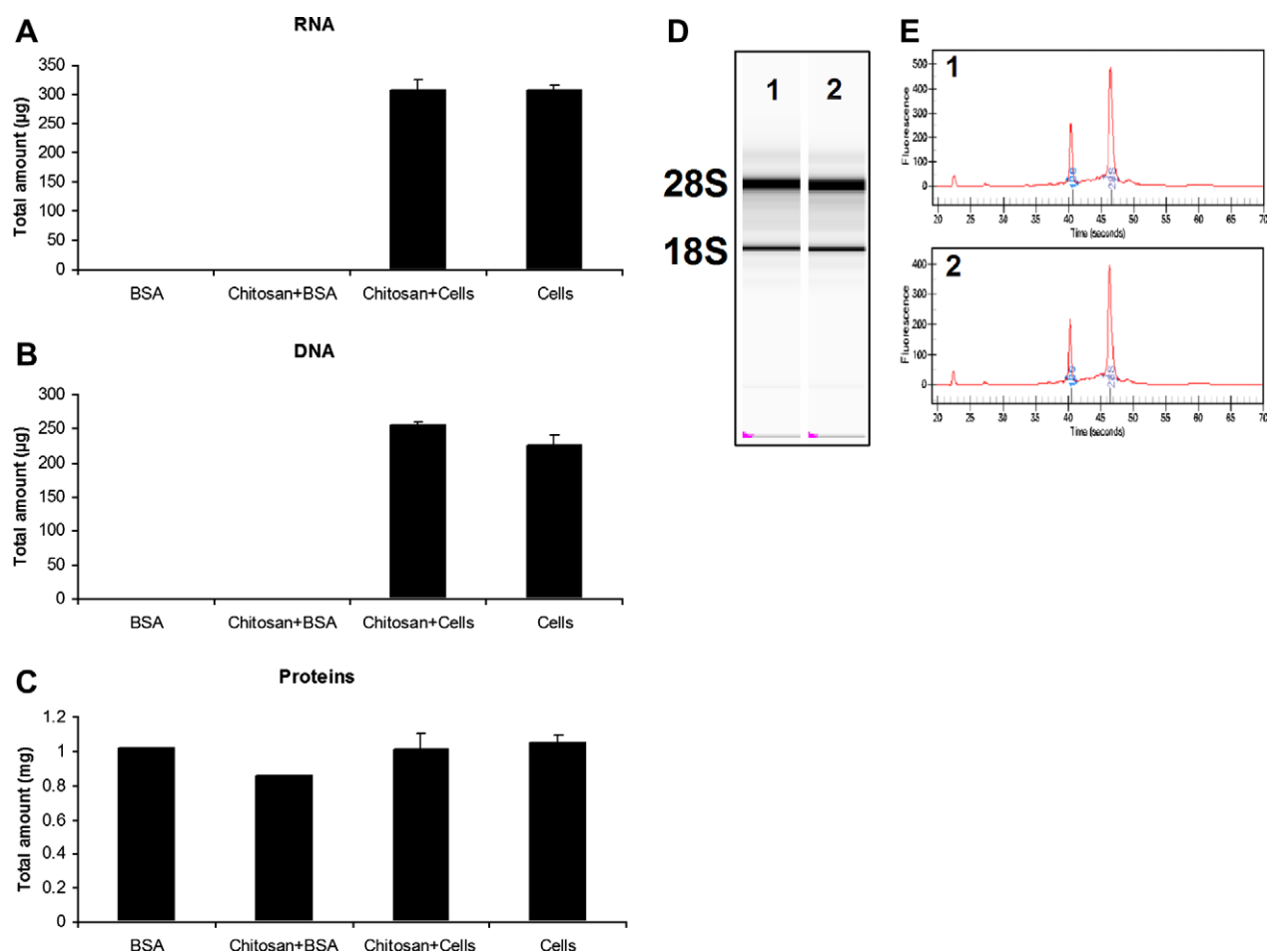


Fig. 1. Recovery of purified RNA, DNA, and proteins using the centrifugation on CsCl cushion-improved protocol and analysis of RNA quality by capillary electrophoresis. Samples consisting of BSA (2 mg) or cells (20×10^6) with or without chitosan (3 mg) were solubilized in a 2.4-M CsCl-containing lysis buffer and ultracentrifuged on a 5.7-M CsCl cushion. RNA was recovered in the bottom of the tubes (A) while DNA was floating on the cushion (B) and proteins were recovered from the 600-µl upper fraction (C). RNA samples purified by centrifugation on CsCl from cells in the absence (1) or presence (2) of chitosan were evaluated using an Experion automated electrophoresis bioanalyzer (D). The relative intensity of the 28S and 18S rRNA bands (E) and the absence of a smear of low-molecular-weight products indicate that RNA molecules were not degraded during the purification process.

into a Beckman SW60 tube on a 1.4-ml high-density cushion (5.7 M cesium chloride [CsCl]¹ and 0.1 M ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA], pH 7) and centrifuged (100,000g, 20 °C, 17 h). After careful removal of the supernatant (containing proteins, DNA, and chitosan) and the upper half of the CsCl cushion, the tubes were rinsed with diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated water without disturbing the remaining CsCl solution. After a second cleaning step, the tubes were inverted and drained carefully. The RNA pellets were then recovered by vigorous vortexing in 70% ethanol, transferred to 1.5-ml Eppendorf tubes, and centrifuged again at 12,000g at 4 °C for 10 min. Finally, the RNA pellets were air-dried and dissolved in 100 µl of DEPC-treated water. Under these conditions, RNA recovery, purity, and quality were not affected by the presence of chitosan (Table 1B and Fig. 1), thereby allowing any type of transcriptomic analysis, including μ -arrays and reverse transcription–polymerase chain reaction (RT–PCR).

Although, representing a major improvement when compared with other procedures, this protocol did not allow proteins and DNA to be recovered for further characterization of valuable samples. As a way to solve this problem, increasing concentrations of

CsCl (0–4.7 M) were added into the lysis buffer to separate DNA and proteins based on their respective densities. Experimental samples consisted of bovine serum albumin (BSA, 2 mg/tube) or cells (20×10^6 L929 cells) in the absence or presence of chitosan

Table 1
RNA purification in absence or presence of chitosan.

Kit	Cells without chitosan		Cells with chitosan		
	RNA (µg)	A_{260}/A_{280}	RNA (µg)	Yield (%)	A_{260}/A_{280}
A					
Ambion kit	7.01	2.02	0.19	2.80	1.58
Roche kit	6.82	1.97	0.33	4.91	1.03
JENA kit	7.12	2.08	0.07	1.03	0.65
TRIzol	7.65	2.00	0.25	3.36	1.76
Procedure	Cells without chitosan		Cells with chitosan		
	RNA (µg)	A_{260}/A_{280}	RNA (µg)	Yield (%)	A_{260}/A_{280}
B					
CsCl	7.38	1.99	7.01	95.11	2.00

Note. Here 5×10^5 cells, alone or mixed with chitosan, were lysed and used for RNA purification according to the respective manufacturers' protocols (A). Amounts of RNA purified by centrifugation on a 5.7-M CsCl cushion are also provided (B). Absorbance at 260 and 280 nm was measured, and A_{260}/A_{280} ratios were calculated. Ratios between 2 and 2.2 are indicative of pure RNA solutions, whereas ratios below 2 strongly suggest DNA or protein contamination [8]. Yields of RNA recovered from lysate with chitosan are further expressed as percentage of RNA recovered from samples without chitosan.

¹ Abbreviations used: CsCl, cesium chloride; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; DEPC, diethylpyrocarbonate; RT–PCR, reverse transcription–polymerase chain reaction; BSA, bovine serum albumin; PBS, phosphate-buffered saline; rRNA, ribosomal RNA; mRNA, messenger RNA.

(3 mg). After centrifugation, the entire volume above the cushion was fractionated as 300- μ l successive fractions and analyzed for protein and DNA contents (not shown). Protein quantification was performed (Micro BCA Protein Assay Kit, Pierce, Rockford, IL, USA) after dialysis against 0.2 M ammonium acetate. DNA content was evaluated by bisbenzimidazole assay [6] using samples diluted (100 \times) in phosphate-buffered saline (PBS). A concentration of 2.4 M CsCl in the lysis buffer allowed the best separation among RNA (in the bottom of the tube), DNA (floating on the cushion), and proteins (recovered from the upper fractions). As illustrated in Fig. 1, chitosan did not reduce RNA and DNA yields and did not interfere with the recovery of the supplemented BSA or cellular proteins. To further investigate the efficiency of this newly established procedure, mouse fibroblasts (L929, 2×10^6 cells) were seeded in duplicate on chitosan or in plastic culture dishes as control. After 24 h, RNA, DNA, and proteins were purified and quantified as described above. DNA yields (in the 50- μ g range) were in good accordance with the number of plated cells and identical for the two culture conditions. Quantitative RT-PCR was also performed [7] with primers specific for 28S ribosomal RNA (rRNA) and GAPDH messenger RNA (mRNA), a housekeeping gene product. A similar amplification was obtained for samples from the two culture conditions (see Fig. 1 in Supplementary material), further illustrating that RNA purified from cells on plastic or chitosan are similarly suitable for any transcriptomic assay. Finally, protein samples were also collected and dialyzed (0.2 M ammonium acetate) to remove the excess of salts before being evaluated by Western blotting analysis using antibodies against GAPDH and vinculin (an essential protein for cell–matrix interactions and actin cytoskeleton formation and function). Similar results were observed for the two culture conditions, demonstrating the feasibility of comparing, using proteomic analysis, cells seeded on chitosan with control substrates.

The development of biomaterials for clinical applications is dictated largely by the constant monitoring of the phenotype of cells growing on or inside the new biomaterial scaffold. Today, high-throughput screening in cell biology is based mainly on transcriptomic and proteomic analyses that require quantitative recovery of high-quality RNA and proteins. Because of its chemical structure and charges, chitosan largely prevents the efficient purification of

nucleic acids by the available standard procedures and commercial kits. Here, we have described a new method that is insensitive to the presence of chitosan and also enables the quantitative recovery of high-quality RNA, DNA, and proteins from a single sample. This new procedure will be most useful for the biological characterization of chitosan-based engineered tissues and their use in the field of tissue repair and regeneration.

Acknowledgments

This research was financially supported by the Walloon Region (Directorate General for Technologies, Research, and Energy [DGTRE], Belgium contract 516025/516262). Alain Colige is a senior research associate of the FRS-FNRS (Belgian National Fund for Scientific Research).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.ab.2009.06.013](https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.06.013).

References

- [1] S.Y. Ong, J. Wu, S.M. Mochhala, M.H. Tan, J. Lu, Development of a chitosan-based wound dressing with improved hemostatic and antimicrobial properties, *Biomaterials* 29 (2008) 4323–4332.
- [2] I.Y. Kim, S.J. Seo, H.S. Moon, M.K. Yoo, I.Y. Park, B.C. Kim, C.S. Cho, Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications, *Biotechnol. Adv.* 26 (2008) 1–21.
- [3] G. Cardenas, P. Anaya, C. von Plessing, C. Rojas, J. Sepulveda, Chitosan composite films: biomedical applications, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 19 (2008) 2397–2405.
- [4] G.I. Howling, P.W. Dettmar, P.A. Goddard, F.C. Hampson, M. Dornish, E.J. Wood, The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro, *Biomaterials* 22 (2001) 2959–2966.
- [5] C. Chatelet, O. Damour, A. Domard, Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films, *Biomaterials* 22 (2001) 261–268.
- [6] A. Davin-Regli, Y. Abed, R.N. Charrel, C. Bollet, P. de Micco, Variations in DNA concentrations significantly affect the reproducibility of RAPD fingerprint patterns, *Res. Microbiol.* 146 (1995) 561–568.
- [7] C.A. Lambert, A.C. Colige, C. Munaut, C.M. Lapière, B.V. Nusgens, Distinct pathways in the over-expression of matrix metalloproteinases in human fibroblasts by relaxation of mechanical tension, *Matrix Biol.* 20 (2001) 397–408.
- [8] C. Wang, J. Hao, F. Zhang, K. Su, D.A. Wang, RNA extraction from polysaccharide-based cell-laden hydrogel scaffolds, *Anal. Biochem.* 380 (2008) 333–334.

Publication N°2 : Development of a Chitosan Nanofibrillar Scaffold for Skin Repair and Regeneration. Tchemtchoua TV, Atanasova G, Aqil A, Filée P, Garbacki N, Vanhootehem O, Deroanne C, Noël A, Jérôme C, Nusgens B, Poumay Y, Colige A. *Biomacromolecules*. 2011 Sep 12;12(9):3194-3204.

Introduction

Les plaies cutanées chroniques, principalement les escarres, les ulcères veineux ou les ulcères liés au diabète, affectent des millions de personnes dans le monde. Les coûts médicaux et socio-économiques qui en résultent se chiffrent en dizaines de milliards de dollars.

En dépit des recherches intensives visant à favoriser l'émergence de nouveaux traitements, il est clair que de nombreux progrès restent à accomplir [129, 178]. Les pansements couramment utilisés de nos jours se contentent essentiellement de protéger la plaie et de maintenir des conditions d'humidité favorables à une cicatrisation naturelle. Celle-ci demeure cependant lente, voire inexistante, et bénéficierait peut-être de l'apport de facteurs régulant l'inflammation ou stimulant la formation d'un tissu de granulation de bonne qualité. C'est dans ce contexte que se sont développées de nouvelles approches thérapeutiques faisant appel à des protéines, humaines ou animales, voire même à des cellules ou des équivalents de peau produits *in vitro* [98, 179]. Même s'ils apportent certaines améliorations, ces nouveaux pansements présentent des désavantages majeurs, notamment en termes de risques de transmission de maladies, de coûts parfois prohibitifs et de contraintes liées à leur utilisation ou leur stockage [98].

Le but à long terme de notre projet multidisciplinaire était de développer un nouveau type de pansement. En plus d'un rôle de protection et de maintien d'une humidité optimale, il devrait stimuler la cicatrisation tout en restant peu coûteux, suffisamment simple dans sa conception et d'une utilisation aisée pour permettre sa commercialisation et son emploi à grande échelle. Notre choix initial pour le matériau composant le pansement s'est porté sur le chitosane, un dérivé partiellement déacétylé de la chitine, en raison de son coût modéré et de ses diverses propriétés biologiques précédemment décrites. Afin qu'il mime au mieux les conditions rencontrées *in vivo* dans le derme, il avait été décidé d'emblée de le mettre en œuvre sous forme de nanofibres de taille similaire à celle des fibres de collagène puis, dans un second temps, de le « bioactiver » par immobilisation de motifs d'adhésion ou de facteurs de croissance pour divers types cellulaires.

La partie de nos travaux décrite ci-après a consisté à caractériser les propriétés biologiques du chitosane, en particulier lorsqu'il est utilisé sous forme de nanofibres.

Résumé des Résultats

Caractérisation *in vitro*

Les premiers tests d'activité biologique du chitosane ont été réalisés *in vitro* en collaboration avec le LabCeTi (FUNDP). Ils portaient sur la morphologie, l'attachement, l'étalement et la prolifération des trois principaux types cellulaires cutanés que sont les fibroblastes, les cellules endothéliales et les kératinocytes. Nos analyses démontrent clairement que le chitosane est un substrat peu adapté à la culture cellulaire lorsqu'il est utilisé sous forme de film ou d'une structure en feuillets multilamellaires obtenus respectivement par évaporation ou lyophilisation. En revanche, et de façon tout à fait remarquable, son utilisation sous forme de nanofibres (produites par le CERM) est propice à l'attachement, l'étalement (Fig. 18) et la prolifération des trois types cellulaires étudiés (Fig. 19), ainsi qu'aux étapes initiales de la différenciation des kératinocytes.

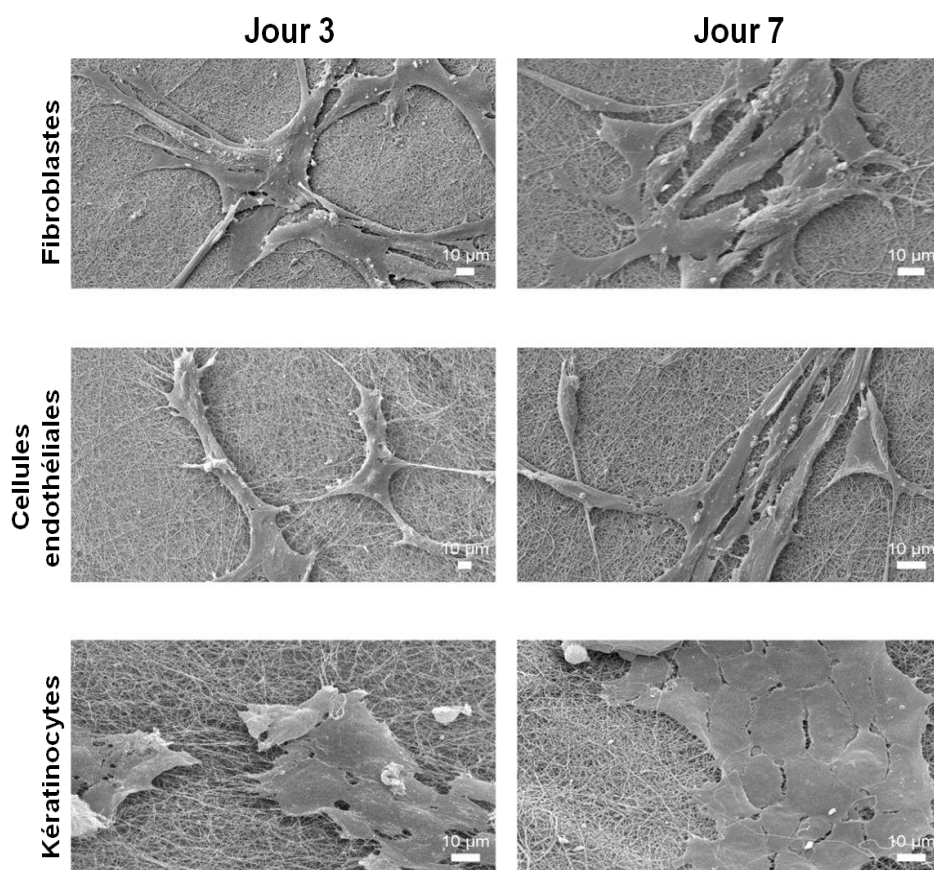


Fig. 18: Sélection d'images, obtenues par microscopie électronique à balayage, de fibroblastes, de cellules endothéliales et de kératinocytes cultivés sur des nanofibres de chitosane.

Les trois types cellulaires présentent une morphologie caractéristique attendue. On remarque notamment un alignement des cellules endothéliales et la formation progressive d'une monocouche de kératinocytes jointifs. Les nanofibres de chitosane apparaissent comme un fin feutrage à ce grossissement.

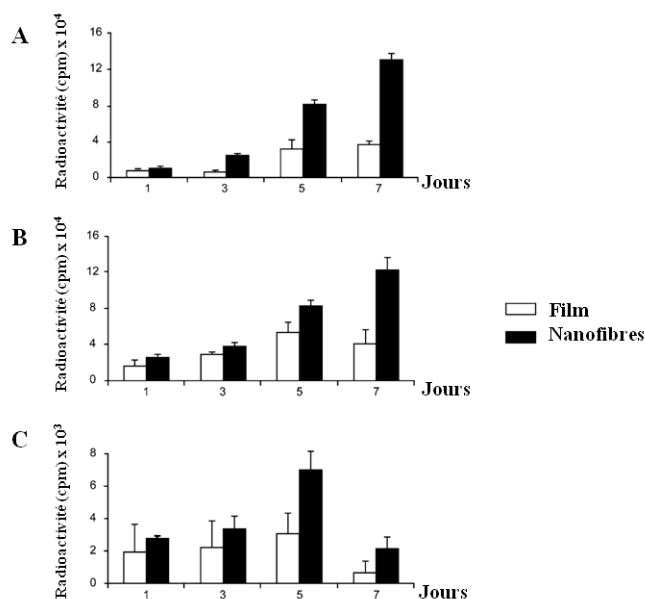


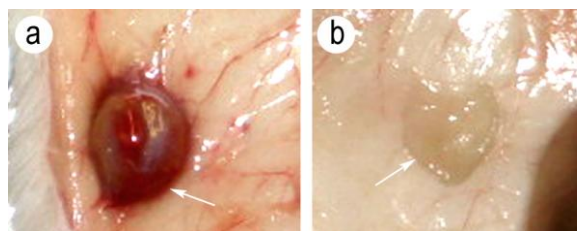
Fig. 19 : Prolifération cellulaire sur des films et nanofibres de chitosane. Les fibroblastes (A), cellules endothéliales (B) et kératinocytes humains (C) ont été cultivés pendant des temps croissant, allant de 1 à 7 jours, sur des films et nanofibres de chitosane. Les cultures ont été incubées pendant 6h en présence de Thymidine-[³H] et la prolifération a été évaluée par quantification de la radioactivité incorporée dans l'ADN cellulaire.

Caractérisation *in vivo*

Afin d'évaluer *in vivo* l'influence de la structure tri-dimensionnelle du chitosane sur sa biocompatibilité, des implants, constitués soit d'un coussin épais de nanofibres ou d'éponges (structure en feuillets), ont été insérés en sous-cutané chez la souris puis prélevés à des temps croissants (Fig. 20).

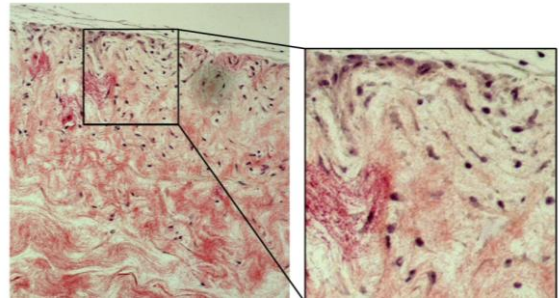
Fig. 20 : Aspect macroscopique des implants de chitosane, constitués de feuillets micrométriques (éponge) (a) ou de nanofibres (b) après 12 semaines d'implantation sous-cutanée.

Les éponges apparaissent comme des structures épaisses et fortement vascularisées. A l'inverse l'implant de nanofibres reste blanchâtre, se confondant dans la face interne du derme.



Des analyses histologiques et immunohistochimiques démontrent une colonisation progressive du réseau de nanofibres par des cellules fibroblastiques (Fig. 21) et par des vaisseaux sanguins, ce qui illustre la parfaite biocompatibilité de cet implant. À l'inverse, les éponges ne sont pas colonisées et induisent la formation d'une épaisse coque conjonctive de type « granulome à corps étranger ».

Fig. 21 : Colonisation cellulaire des nanofibres de chitosane. Huit semaines après implantation sous-cutanée, l'implant de nanofibres de chitosane a été récolté, fixé et inclus en paraffine. Des coupes de 5µm d'épaisseur ont été colorées à l'hématoxyline/éosine. Les nanofibres de chitosane apparaissent teintées en rouge comme des structures ondulantes et sont colonisées par des cellules adoptant l'orientation de ces dernières.



Les observations par microscopie électronique (LabCeTi) révèlent par ailleurs les interactions étroites s'établissant au sein du matériau nanofibrillaire entre les nanofibres, les cellules fibroblastiques et les fibrilles de collagène nouvellement synthétisées et déposées au sein du réseau nanofibrillaire (Fig. 22).

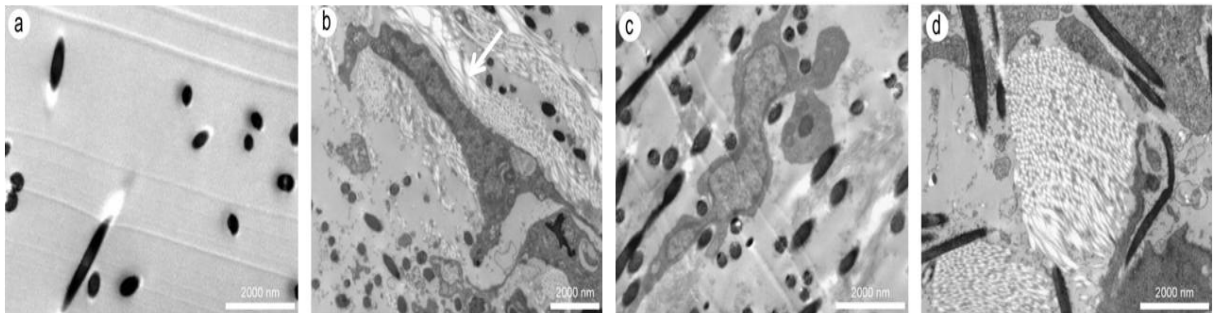


Fig. 22 : Evaluation par microscopie électronique de la colonisation du réseau de nanofibres de chitosane. Les nanofibres de chitosane apparaissent en noir sous une forme allongée ou circulaire, suivant le plan de coupe, ainsi qu'observé sur des échantillons analysés avant implantation (a). Les analyses réalisées sur des échantillons récoltés 12 semaines après implantation confirment la présence de cellules fibroblastiques synthétisant du collagène (flèche blanche (b)). On retrouve également des cellules imbriquées au sein des nanofibres de chitosane, dans des situations suggérant une migration cellulaire (c). Des dépôts de collagène sont également observés en contact étroit avec le chitosane (d).

Les propriétés du chitosane nanofibrillaire ont été caractérisées plus en détails dans un modèle de cicatrisation cutanée chez la souris. Par rapport aux plaies non-traitées, le matériau nanofibrillaire accélère la formation et l'organisation du tissu de granulation, stimule la réépithélialisation de la plaie (Fig. 23) et semble favoriser la régénération des annexes.

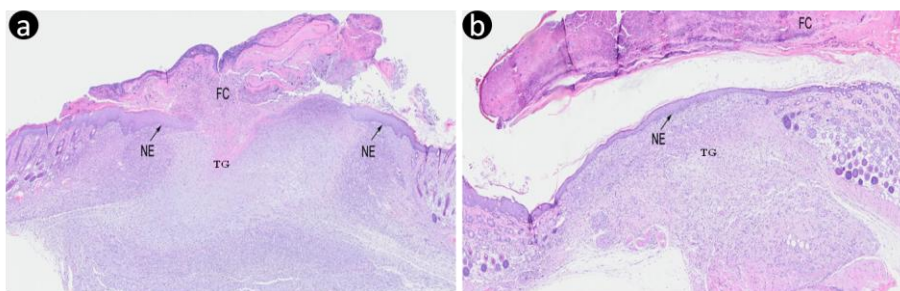


Fig. 23 : Caractérisation des plaies cutanées, recouvertes ou non de nanofibres de chitosane, 14 jours après leur réalisation. Des excisions de peau ont été réalisées à l'aide d'un emporte-pièce de 8 mm et recouvertes de nanofibres de chitosane (b) ou non (a). Les animaux ont été sacrifiés aux jours 7, 14 et 21. Les zones excisées, ainsi que les régions avoisinantes, ont ensuite été prélevées, fixées et incluses en paraffine pour des analyses histologiques après coloration à l'hématoxyline/éosine. Les bordures initiales de la plaie sont localisées aux deux extrémités des photos. Sur les échantillons collectés, on note la couverture complète du tissu de granulation (TG) par le néoépiderme (NE) lorsque les plaies ont été recouvertes de chitosane (b) par rapport aux conditions contrôles (a) où la ré-épithélialisation n'est que débutante. FC : caillot de fibrine.

Discussion

Le développement d'un pansement visant à accélérer la cicatrisation des plaies cutanées et à améliorer les qualités fonctionnelles du tissu cicatriciel nécessite une caractérisation préalable de ses composants. Sur base de la littérature et de notre expertise dans le domaine, notre choix s'est porté sur un pansement réalisé à partir de nanofibres de chitosane. Les propriétés des nanofibres de chitosane ont été évaluées *in vitro* et *in vivo* et comparées à celles du chitosane sous forme d'un film ou d'un matériau tridimensionnel multilamellaire (éponge), afin de préciser si les effets observés résultent uniquement de la nature chimique du chitosane ou de son organisation architecturale.

Notre étude démontre clairement que des films et des éponges de chitosane sont des substrats de culture médiocres pour les trois types cellulaires évalués au cours de ce travail, en particulier les fibroblastes et les cellules endothéliales. Ces résultats sont a priori surprenants au regard de la littérature qui décrit le chitosane comme un biomatériau présentant une biocompatibilité élevée en culture. Cette apparente contradiction s'explique aisément par le fait que ces études antérieures évaluaient le plus souvent des cellules transformées et d'origine non cutanée ou utilisaient du chitosane en association avec d'autres macromolécules. Une des observations originales de notre étude est donc clairement la mise en évidence des propriétés spécifiques des nanofibres de chitosane et la démonstration qui en découle que la structure tridimensionnelle d'une macromolécule est un élément essentiel à prendre en compte dans l'évaluation de ses propriétés biologiques. Les caractérisations que nous avons réalisées *in vivo* en apportent d'ailleurs une preuve supplémentaire. Alors qu'une éponge de chitosane

induit une réaction immunitaire, qui se manifeste par la formation rapide d'un granulome à corps étranger, un implant sous-cutané nanofibrillaire ne provoque pas de réaction inflammatoire significative et est envahi par des cellules fibroblastiques qui y déposent une matrice extracellulaire similaire à celle formant le derme. De manière encore plus remarquable, les analyses immunohistochimiques suggèrent que l'orientation générale des nanofibres de chitosane guide la migration cellulaire et dicte l'organisation de la matrice extracellulaire néo-formée qui s'y dépose. Ces observations suggèrent que les nanofibres de chitosane pourraient être un matériau de choix dans les domaines de la réparation et de l'ingénierie tissulaire pour lesquels une orientation des cellules et des composants matriciels serait un avantage, voire un atout essentiel, comme dans le cas de la réparation des tendons ou du derme par exemple.

Nos études réalisées chez la souris dans un modèle de plaie cutanée ont montré qu'un pansement formé d'un tapis dense de nanofibres stimule la formation du tissu de granulation, la fermeture de la plaie par le néoépiderme et la régénération des annexes. Les mécanismes à l'origine de ces effets bénéfiques peuvent être envisagés selon plusieurs hypothèses. À titre d'exemple, on peut citer la régulation de l'activité des cellules inflammatoires par le chitosane ou ses produits de dégradation (glucosamine et N-acétylglucosamine) et/ou la complexation de composants toxiques (radicaux libres,...) par le chitosane dont le rapport surface disponible/volume est très largement accru sous sa forme nanofibrillaire. On peut exclure en revanche un effet lié à la colonisation du biomatériau puisque la réparation est très rapide dans ce modèle et que le pansement se détache de la plaie environ 7 jours après son application. Il est toutefois possible que, dans des situations où la cicatrisation est lente, le comblement de la plaie soit favorisé par l'envahissement et le remodelage de la matrice nanofibrillaire du pansement. La vérification de cette hypothèse fait d'ailleurs partir de nos perspectives de recherches futures.

Publication N°2

“Development of a Chitosan Nanofibrillar Scaffold for Skin Repair and Regeneration”.

Tchemtchoua VT, Atanasova G, Aqil A, Filée P, Garbacki N, Vanhooiteghem O, Deroanne C, Noël A, Jérôme C, Nusgens B, Poumay Y, Colige A.

Biomacromolecules. 2011 Sep 12;12(9):3194-3204.

Development of a Chitosan Nanofibrillar Scaffold for Skin Repair and Regeneration

Victor T. Tchemtchoua,^{†,▽} Ganka Atanasova,^{§,▽} Abdel Aqil,^{||} Patrice Filée,[⊥] Nancy Garbacki,[†] Olivier Vanhoogteghem,[#] Christophe Deroanne,[†] Agnès Noël,[‡] Christine Jérôme,^{||} Betty Nusgens,[†] Yves Poumay,[§] and Alain Colige^{*,†}

[†]Laboratory of Connective Tissues Biology and [‡]Laboratory of Tumor and Development Biology, GIGA-R, University of Liège, 3 avenue de l'Hôpital, B-4000 Liège, Belgium

[§]Laboratory of Cells and Tissues, Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, 61 rue de Bruxelles, B-5000 Namur, Belgium

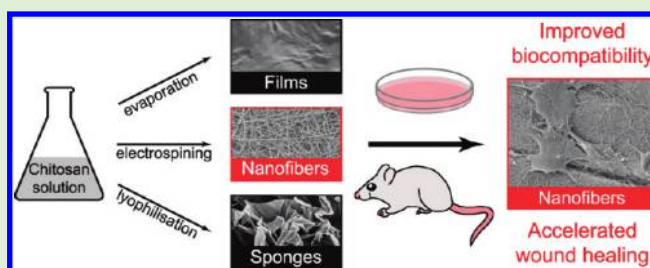
^{||}Center for Education and Research on Macromolecules and [⊥]Center of Proteins Engineering, University of Liège, 3 Allée de la Chimie, B-4000 Liège, Belgium

[#]Sainte-Elisabeth Hospital, 15 Place Louise Godin, B-5000 Namur, Belgium

S Supporting Information

ABSTRACT: The final goal of the present study was the development of a 3-D chitosan dressing that would shorten the healing time of skin wounds by stimulating migration, invasion, and proliferation of the relevant cutaneous resident cells. Three-dimensional chitosan nanofibrillar scaffolds produced by electrospinning were compared with evaporated films and freeze-dried sponges for their biological properties. The nanofibrillar structure strongly improved cell adhesion and proliferation in vitro. When implanted in mice, the nanofibrillar scaffold was colonized by mesenchymal cells and blood vessels.

Accumulation of collagen fibrils was also observed. In contrast, sponges induced a foreign body granuloma. When used as a dressing covering full-thickness skin wounds in mice, chitosan nanofibrils induced a faster regeneration of both the epidermis and dermis compartments. Altogether our data illustrate the critical importance of the nanofibrillar structure of chitosan devices for their full biocompatibility and demonstrate the significant beneficial effect of chitosan as a wound-healing biomaterial.



INTRODUCTION

Skin is the largest organ of the body, covering and protecting its entire surface and representing ~15% of the total body mass.¹ It is formed by three connected layers. The outer layer, the epidermis, is a stratified and highly cellular structure that provides skin with its vital barrier function. It is mainly composed of layers of keratinocytes in different stages of differentiation but also contains other cell types such as melanocytes. The dermis is separated from the epidermis by the basement membrane. It largely consists of an extracellular matrix scaffold rich in collagen, elastin, hyaluronan, and proteoglycans, conferring elasticity and mechanical resistance. Fibroblasts, the major cell type present in the dermis, are responsible for most of the synthesis of extracellular matrix components. Endothelial cells forming blood vessels are also abundant in this skin compartment. The hypodermis contains adipose tissue, is well vascularized, and participates in both the thermoregulatory and mechanical properties of the skin.²

Chronic dermal wounds, as venous ulcers, pressure sores, and diabetic foot ulcers, represent a major health problem that affects millions of people worldwide and induces billions dollars of

social and economic costs,^{3,4} explaining the large research efforts focused on the development of new therapeutic approaches and dressings that could improve the impaired healing process.^{5,6} The entire process of normal cutaneous wound healing can be divided into different phases that can, however, interplay with a significant temporal overlap.^{7,8} After platelet aggregation and growth factors release upon degranulation, neutrophils and macrophages are recruited to the site of injury. Their primary roles are the cleansing of the wound and the secretion of soluble factors required for initiation of the proliferating phase. However, an excessive inflammation depresses the healing rate by excessive production of ROS and proteases.⁹ During the proliferative phase, recruited myofibroblastic cells multiply in response to growth factors and start to synthesize extracellular matrix macromolecules such as fibrillar collagens.¹⁰ Capillary formation, as a result of endothelial cells recruitment and proliferation, is also observed, which provides fibroblasts with oxygen and nutrients.⁷

Received: May 18, 2011

Revised: July 15, 2011

Published: July 15, 2011

During the remodeling phase, the newly deposited collagen fibrils that were initially poorly organized are progressively replaced by fibrils that align in a specific orientation dictated by both the environment and the mechanical forces developing in the wounded region. This is of crucial importance not only because it restores the mechanical resistance of the skin but also because it strongly regulates the phenotype of cells in the repaired tissue. Finally, the epithelial barrier is restored through processes of keratinocytes proliferation, migration, and differentiation.

Besides physical therapeutic approaches, such as cleansing, debridement, and compression in the specific case of venous ulcers, there is currently no gold standard treatment or dressing for improving the healing of ulcers. Most of the modern dressings (hydrocolloids, alginate, hydrogels) aim mainly at maintaining a moist environment, absorbing excess exudates, allowing gas exchange, and providing protection against bacteria infection (for review, see ref 11). None of them, however, directly stimulates the healing process, which explains why more advanced dressings have been developed.¹² Three main types of skin substitutes are commercially available (for review, see ref 13). In the first type, the main components are extracellular matrix macromolecules, such as collagen from animal origin, intended to provide a 3-D scaffold to the own cells of the patient. The second type consists of an acellularized and stabilized tissue such as skin or small intestine submucosa, from human or animal sources, whereas the third type contains human living cells, either autologous or heterologous. Despite intense works to improve their therapeutic effects, none of them can be considered to be an ideal and universal wound dressing because they suffer from several drawbacks such as safety and immunological problems related to the human or animal origin of their components, highly variable proven beneficial effects, high price, and limited storage. A new area of research in dermatology aims at investigating biocompatible macromolecules, either synthetic or from non-animal origin, that could be used as matrices for wound covering and for improving the healing process, especially in the case of "hard-to-heal" chronic ulcers. Among these macromolecules, chitosan, a linear polysaccharide obtained by partial deacetylation of chitin and composed of randomly distributed β -(1,4)-linked *N*-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine, is considered to be one of the most promising biomaterials for tissue-engineered scaffolds and tissue repair.¹⁴ Indeed, it possesses several relevant properties such as proven innocuity, stability over extended period of time under various conditions, progressive biodegradability, and bacteriostatic activity, in addition to be relatively cheap.^{15,16} It is also considered to be biocompatible because it was reported to support cell adhesion and spreading in vitro and to be devoid of antigenicity in vivo. However, most of these studies, although providing valuable information, are not fully relevant for evaluating the benefit of using pure chitosan for favoring the healing process and for improving the mechanical and biological quality of the repaired skin. As examples, some previous works evaluated chitosan in association with other macromolecules, such as gelatin¹⁷ and collagen,¹⁸ preventing the characterization of their specific respective effects, whereas some others used chitosan as films, granules, or sponges,^{19–21} so structures lacking the nanofibrillar structure that are present in the dermis. Finally, a limited number of studies have reported preliminary characterizations of nanofibrillar chitosan used as a cell substrate for immortalized cells or primary cells that are not involved in skin repair.^{22,23} This large diversity of experimental

conditions probably explains why some data about chitosan are sometimes contradictory^{21,24} and illustrates the need for a dedicated study.

The aim of this study was to evaluate the suitability of using pure chitosan for designing a dressing that would improve cutaneous wound healing. It could also lead to the development of a new type of biomaterial for tissue engineering and regenerative medicine. Because it is well known that the architectural organization of the extracellular matrix strongly influences its biological properties,^{25–27} 2-D chitosan films, 3-D chitosan sponges, and 3-D nanofibrillar scaffolds were compared. In vitro characterizations were performed using human primary cells that are central for the skin repair process: keratinocytes, fibroblasts, and endothelial cells. The potential induction of any adverse effect or of immune reaction against chitosan was also evaluated in vivo at increasing time after subcutaneous insertion, an experimental situation that allows long-term contact and follow-up of the biomaterial. Finally, the effect of chitosan nanofibers on the rate of healing was also determined in mice in a model of full thickness wounds.

■ EXPERIMENTAL SECTION

Materials. Ultrapure, medical-grade chitosan produced from dedicated mushroom cultures (KiOmedine-CsUP, batch number L07293CsU) with a degree of acetylation of 16% and a molecular weight of 67 000 was a gift from Kitozyme (Belgium). High-molecular-weight polyethylene glycol (PEG, 900 000 g/mol) was from Aldrich. All chemical and biochemical reagents were of analytical grade.

Preparation of Chitosan Films, Nanofibers Scaffolds, and Sponges. *Films.* The solution of chitosan (1% w/v in 1% acetic acid) was filtered through 0.22 μ m filters (Millipore), poured in 12 wells culture plates (1 mL/well), and air-dried for 24 h in a laminar flow culture hood under sterile conditions. After complete drying, films were immersed for 2 h in 1% NaOH for neutralizing the residual acetic acid. Chitosan films were then extensively rinsed in sterile distilled water and dried. Before use in culture, films were pre-equilibrated for 2 h in the culture medium at 37 °C.

Sponges. Chitosan sponges were produced by Kitozyme by freeze-drying 2% chitosan solution in 1% acetic acid. The chitosan sponges were sterilized by immersion in 70% ethanol and extensively rinsed in sterile PBS before use.

Electrospun Nanofibers Scaffolds. The electrospinning solution was prepared by mixing 3 g of chitosan solution (at 10.5% in 6.5% acetic acid) and 1 g of PEG solution (at 4% in distilled water). We then poured 2 mL in a 5 mL plastic syringe fitted with blunt-tipped stainless steel needles (gauge 18 and 21). The solution feed was driven using a syringe pump (Razel Scientific Instruments). A 30 kV electrospinning voltage was applied between the needle and the collector (aluminum foil) by the use of a Spellman SL10 power supply. The positive electrode of a high voltage power supply was connected to a metal capillary by copper wires. The distance between the tip of the needle and the surface of the aluminum foil used as a collector was 15 cm, and the flow rate of the solution was 0.75 mL/h. All electrospinning procedures were performed at room temperature. The scaffolds were then stabilized by immersion into 1 M NaOH before extensive washing in distilled water. At this step, biophysical analyses revealed that nanofibers were formed from chitosan only, PEG having been solubilized and removed during the successive washing steps (Figure S1, Supporting Information). The electrospun scaffolds were then sterilized (70% ethanol for 2 h) and washed with sterile PBS before in vivo assays or equilibrated at 37 °C during 2 h in culture medium before in vitro assays.

Cell Cultures. Fibroblasts were isolated from a human skin biopsy and used at passage 3–4. Endothelial cells (HMEC) were from dermal microvascular origin, and keratinocyte cultures were established from human skin biopsies.²⁸

Fibroblasts and HMEC were grown in Dulbecco's minimum essential medium (DMEM, Lonza) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Lonza), antibiotics (100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin, Lonza), and nonessential amino acids (Lonza). Keratinocytes were grown in keratinocyte growth medium (KGM-2, Clonetics) supplemented with antibiotics (50 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin, Sigma) and with SingleQuots KGM-2 (Clonetics) at a final concentration of 50 µg/mL bovine pituitary extract, 10 ng/mL EGF, 5 µg/mL insulin, 5 µg/mL transferrin, and 5×10^{-7} M hydrocortisone. Cultures were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

In Vitro Evaluation. *Cell Morphology.* Time course evaluations of cell morphology, adhesion, and spreading were investigated by microscopic examination for the three cell types. Phase-contrast light microscopy was used for cultures on chitosan films. Cells on the opaque electrospun scaffolds had to be observed by scanning electron microscopy (SEM). In brief, the chitosan scaffolds and adherent cells were fixed for 10 min at 4 °C in 2.5% glutaraldehyde in sodium cacodylate buffer (0.1 M sodium cacodylate, pH 7.4, 0.1% CaCl₂). After being rinsed three times for 5 min in sodium cacodylate buffer, samples were dehydrated in graded ethanol at 25, 50, 75, 95, and 100% and then subjected to critical point drying. The scaffolds were then sputtercoated with a thin gold layer. The samples were examined and photographed in a Phillips XL20 SEM. Keratinocytes cultured on electrospun chitosan scaffolds were fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min, dehydrated in methanol and toluol, and then embedded into paraffin. For histological staining, keratinocytes were seeded at near confluency and cultured for 7 days to obtain a monolayer of cells. The nanofibrillar scaffold supporting the cells was then carefully detached, fixed, embedded in paraffin, sectioned, and stained with hematoxylin.

Proliferation. Cell proliferation was evaluated by measuring of ³H-thymidine incorporation into TCA-insoluble DNA. In brief, cells were seeded on films or electrospun scaffolds at a density of 15×10^3 cells in 12-well multiplates. The culture medium was renewed every other day. After 1, 3, 5, or 7 days, 2.5 µL/mL of [³H]-thymidine (2.5 Ci/mol) was added. Six hours later, cells were washed and sonicated in PBS. DNA was collected by precipitation with cold TCA (10% final concentration, 20 min on ice) and filtration on glass microfibre filter (GF/A, Whatman). After being washed with 5% cold TCA and drying, the TCA-insoluble tritiated material was quantified by liquid scintillation (Aqualuma plus, LUMAC.LSC.B.V).

Differentiation of Keratinocytes. Total RNA was purified from cultures at days 7, 14, and 21 after seeding on chitosan nanofibers scaffolds according to an original procedure that we recently developed, allowing the efficient recovery of proteins and nucleic acids from cells in contact with chitosan.²⁹ After reverse transcription of RNA (SuperScript II reverse transcriptase, Invitrogen, Merelbeke, Belgium), cDNAs were amplified using Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Halle, Belgium) in a 7300 real-time PCR machine (Applied Biosystems). The primer pairs were specific for keratin 14 (sense: 5'-CGATGGCAAGGTGGTGTGTC-3'; antisense: 5'-GGGTGAAGCAGGGTCCAG-3'), keratin 10 (sense: 5'-AATCAGATTCTCAACCTAACAC-3'; antisense: 5'-TTCCTCTTGCTTTGATGGG-3'), involucrin (sense: 5'-TGAACAGCCCAACTCCAC-3'; antisense: 5'-CTCATCCAGCACCCTACG-3'); and 36B4 (sense: 5'-ATCAACGGGTACAAACGAGTC-3'; antisense: 5'-CAGATGGATCAGCCAAGAAGG-3'), a house-keeping gene used for normalization of the results.

In Vivo Evaluation. All procedures were performed with the approval of the Animal Ethical Committee authorities of the University of Liège (Sart Tilman, Belgium). Before the experiment was started,

8–10 week-old Balb/C mice received a subcutaneous injection of Temgesic (0.05 mg/kg) to prevent pain. This treatment was continued twice daily for 10 days. After anesthesia with intramuscular injections of Domitor (500 µg/kg) and Ketamine (60 mg/kg), the animals were treated as described below.

Biocompatibility of Implanted Chitosan Sponges and Electrospun Nanofibers Scaffolds. We sterilized 8 mm diameter chitosan electrospun scaffolds (2 mm thick) and sponges (4 mm thick) in 70% ethanol and soaked them in sterile physiological saline solution. The back skin was shaved, and the nanofibers scaffolds or sponges were implanted subcutaneously at two lateral sites in the back through a 1 cm incision. Waking up was induced by intramuscular injection of Antisedan (200 µg/kg). Groups of mice were sacrificed at 1, 2, 4, 8, or 12 weeks after implantation. Serum was collected for testing the presence of anti-chitosan antibodies. Sponges or nanofibers scaffolds, including surrounding adherent tissues, were harvested, fixed, and used for histological examination or transmission electron microscopy, as described below.

Wound Healing Assay. Thirty 10-week-old Balb/C mice, weighing 20 ± 3 g, were obtained from the Animal Facility of the University of Liège. The back skin was carefully shaved, and a full thickness (epidermis and dermis) skin wound was performed with an 8 mm punch, a procedure that induces a minimal bleeding that stops after a few seconds. In half of the mice, a chitosan nanofiber dressing covering the entire wound was applied and moistened with one drop of sterile saline solution. For the second half of the mice, used as controls, the wound was only moistened. All wounds were then covered successively by a Tegaderm adhesive dressing and by an Elastoplast bandaging tape that remained in place throughout the experiment, which aimed at protecting the wound and preventing its contraction. Mice were placed in individual cages, and five animals of each group were euthanized on days 7, 14, and 21. The entire wound areas, including a surrounding skin margin of 5 mm, were harvested, cut in two identical pieces, fixed in 4% formalin solution, and embedded in paraffin for histological analysis, as described below.

Histology and Transmission Electron Microscopy Analysis. Pieces of implanted chitosan, in the form of either sponges or nanofibers scaffolds, were fixed in 4% formalin and embedded in paraffin using routine protocol. Five µm thick sections were stained with hematoxylin/eosin or used for immunohistochemistry analyses.

Different primary antibodies were used to identify leukocytes (monoclonal rat antimouse CD45, at 1:500, Pharmingen), macrophages (monoclonal rat antimouse F4/80, at 1:150, AbD Serotec), mesenchymal cells (polyclonal guinea pig antibody against vimentin, at 1:20, Qartett), endothelial cells (monoclonal rat antimouse CD31, at 1:20, Dianova), type III collagen, and type IV collagen (in-house developed rabbit antiserum, at 1:100). After being washed, sections were then incubated with HRP-coupled secondary antibodies. Staining was obtained using diaminobenzidine (brown) or aminoethylcarbazole (red) as substrates.

For TEM observation, a second piece of the implant was fixed for 18 h at 4 °C in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate (pH 7.4) and then for 1 h at 4 °C in 1% osmium tetroxide in 0.1 M sodium cacodylate, pH 7.4. Samples were then dehydrated with increasing concentrations of ethanol and propylene oxide and embedded in LX112 resin (LADD, Williston, Vermont, USA) before polymerization at increasing temperatures (37 °C for 24 h; 47 °C for 24 h; 60 °C for 48 h). For orientation purpose, 2 µm sections were performed, stained with toluidine blue, and observed by light microscopy. Ultrathin sections (50–70 nm) were cut, stained with uranyl acetate, contrasted with lead citrate, mounted on uncoated grids, and observed by TEM (FEI Tecnai 10, Eindhoven, The Netherlands).

For the excisional wounds, 5 µm sections were stained with hematoxylin/eosin or, for immunohistochemistry analysis, using primary antibodies against type IV collagen according to the protocol described above.

Detection of Antichitosan Antibodies by ELISA. An ELISA assay was developed to evaluate the potential presence of circulating antibodies

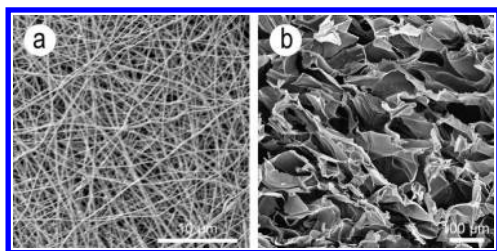


Figure 1. Scanning electron micrograph of the scaffold of chitosan nanofibers produced by electrospinning (a) and of the chitosan sponge obtained by freeze-drying technique (b).

against chitosan in mice implanted with chitosan sponges or electrospun nanofiber scaffolds. Ninety-six wells plates were coated for 2 h with chitosan (180 μ L per well, 1% solution in 1% acetic acid) incubated for 2 h at room temperature, washed twice for 20 min with 20 mM Tris buffer (pH 7.6), and then blocked overnight at 4 $^{\circ}$ C by 5% bovine serum albumin in PBS (BSA/PBS). Plates were washed three times with PBS containing 0.05% Tween 20 (PBS/Tween). Serum samples from chitosan-implanted mice were serially diluted in BSA/PBS and dispensed in duplicate. Negative and positive controls were, respectively, BSA/PBS and BSA/PBS containing antichitosan antibody (generous gift of Daniel Hartmann, Laboratoire des Biomatériaux et Remodelages Matriciels, EA 3090, Lyon, France). Plates were incubated overnight at 4 $^{\circ}$ C. After washing with PBS/Tween, the HRP-coupled secondary antibody was added (100 μ L of rabbit antimouse IgG at 1:1000 for experimental samples and goat antirabbit IgG at 1:1000 for positive control). Plates were incubated for 2 h at room temperature and then washed in PBS/Tween. Staining was obtained by the addition of a solution of 1 mM ABTS containing 0.03% H_2O_2 and incubation for 1 h at 37 $^{\circ}$ C in the dark. The reaction was stopped by the addition of a solution of 1% SDS. OD at 405 nm was measured by using a microplate spectrophotometer.

RESULTS AND DISCUSSION

Three-Dimensional Architecture of the Chitosan Sponges and Nanofibrillar Scaffold. Three different types of substrate made of pure chitosan were created to evaluate the relationship between the structure of the material and its biocompatibility. As a way to improve the relevance of our data for further use in clinic, we used chitosan produced from dedicated mushroom cultures because it should facilitate GMP and medical-grade production as compared with chitosan produced from wastes of fishing industry and should be less susceptible to residual contamination and batch to batch variability.³⁰ Two-dimensional films and three-dimensional sponges were produced by evaporation or freeze-drying of a chitosan solution, respectively. Production of chitosan nanofibers by electrospinning can hardly be performed by using pure chitosan solutions. This results from their inappropriate viscosity and from the presence of a large excess of positive charges on the chitosan molecules at the pH required for its complete solubilization. Various concentrations of PEG of different molecular weights were tested as an additive to improve these critical biophysical properties. For the medical-grade chitosan used here, the best conditions for electrospinning were determined to be solutions containing 7.9% chitosan and 1% PEG (900 kDa), a voltage of 30 kV, a flow rate of 0.75 mL/h, and a needle-to-collector distance of 15 cm.

The size, morphology, and surface topography of the electrospun nanofibers and of lyophilized sponges were investigated by SEM (Figure 1). Individual electrospun nanofibers had a mean

diameter in the range of 50 to 200 nm. This nonwoven material delineated small pores with a diameter of $<5 \mu$ m and had porosity $>90\%$. In contrast, sponges appeared as intertwined micrometric-thick lamellae delimiting irregular spaces that can extend up to 100 μ m. At the cell level, a sponge can therefore be considered to be a 3-D material formed by connected films separated by large pores.

Cell Attachment, Spreading, and Proliferation in Vitro.

Preliminary studies were performed using films, sponges, and nanofibrillar scaffolds to determine the best experimental conditions. During this initial testing, it appeared that the use of sponges in vitro suffers from several limitations such as the low level of cell attachment, the impossibility of obtaining monolayers, and the difficulties of observing a significant number of cells because most of them accumulate at the bottom of the large pores. As a result, only films and nanofibers were compared for their biocompatibility in vitro.

Cell Morphology and Spreading. The morphology, adhesion, and spreading of fibroblasts, endothelial cells, and keratinocytes seeded on chitosan films were evaluated by phase-contrast microscopy. Cells on plastic were also observed as a control for their morphology in classical culture conditions. On plastic, the three cell types were already fully attached and spread at day 1 and reached confluence within 1 week (Figure 2), as expected for these normal primary cells. They displayed the expected morphology specific to each cell type. In contrast, fibroblasts and endothelial cells seeded on chitosan films failed to spread fully, even after 7 days, and rapidly stopped multiplying. This did not result from a potential toxicity of chitosan because cells recovered from cultures on chitosan films at day 1 or 3 and seeded back on plastic in their own conditioned culture medium rapidly adhered, spread, and started to proliferate (not shown). For keratinocytes, a delay in attachment and spreading on chitosan films was also observed, although to a lesser extent as compared with the other cell types. Initially, keratinocytes seeded on chitosan films multiplied in a similar manner as those seeded on plastic culture dishes, but they were not able to form a confluent monolayer. This growth arrest was correlated with atypical cell morphology. Keratinocytes were swollen, with condensed nucleus and without nucleolus, an observation often associated with cell suffering and even cell death.

Cells seeded on electrospun chitosan nanofibers were observed by SEM as a result of the opacity of the material (Figure 3). The three cell types already adhered at day 1, were fully spread at day 3 and proliferated with time, in contrast with their behavior on chitosan films. It has to be noticed that keratinocytes at day 7 tend to form clusters of flat cells tightly joined together, a physiological and essential property of keratinocytes in vivo for forming a physical tight barrier.

This observation was further confirmed by histochemistry, showing a continuous layer of epithelial cells at the surface of the electrospun nanofibers scaffold (Figure 4). Longer culture durations allowing the formation of multilayers of keratinocytes were not investigated here because our primary goal was to evaluate the phenotype of keratinocytes directly in contact with nanofibers.

SEM examination at higher magnification of fibroblast cultures (Figure 5a) showed cellular extensions closely interacting with individual nanofibers, explaining why electrospun chitosan induces cell spreading. It was also observed that these cells were able to progressively invade the superficial layers of the scaffold (Figure 5b). This modification of the morphology, induced by

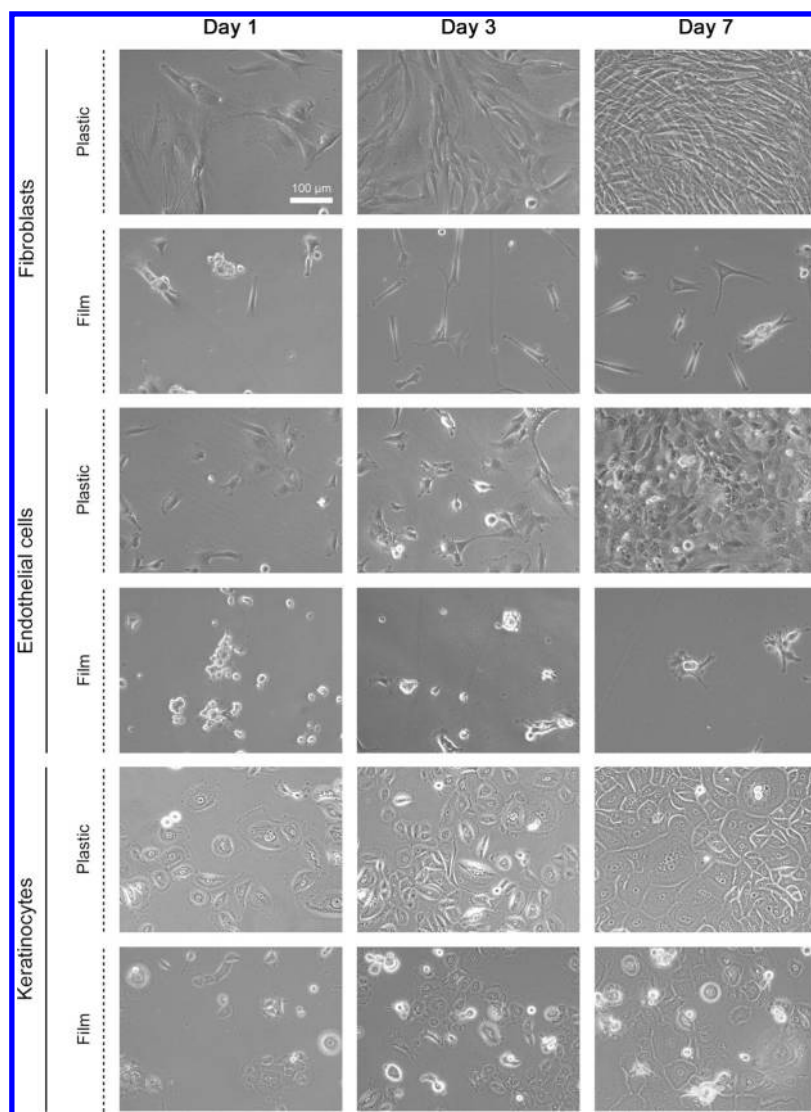


Figure 2. Phase contrast microscopy observation of human fibroblasts, microvascular endothelial cells, and keratinocytes cultured on plastic or on a film of chitosan for 1, 3, or 7 days.

interactions with the surrounding nanofibers, is considered to be a master switch regulating the survival and the phenotype of many cells types, especially cells of connective tissues as fibroblasts and endothelial cells.^{31–33}

Cell Proliferation. A [³H]-thymidine incorporation assay was used to quantify the differences in the proliferation rate of the three cell types cultured on chitosan films and electrospun nanofibers scaffold. Cultures on plastic were also tested to verify the cell viability and their capacity to proliferate. On average, three to five-fold higher incorporation per cell unit was observed for cells on plastic as compared with cells on chitosan films (not shown), which confirmed microscopic observations (Figure 2). Three- to four-fold increases were observed between days 1 and 5 for fibroblasts (Figure 6a) and endothelial cells (Figure 6b) cultured on chitosan films. However, no significant increase occurred later, demonstrating that cells stopped proliferating, even though they were not confluent, again confirming that a chitosan film is a poor substrate for cells of mesenchymal origin. This is most probably related to inappropriate adhesion and spreading which, in turn, lead to progressive cell death through a

process named anoikis.^{34,35} In contrast, cells on chitosan nanofibers proliferated faster and kept growing during the entire experiment, which was in line with the microscopic observations (Figure 3) and demonstrated the benefit of using a nanofibrillar material. Keratinocytes adhered in a similar manner on chitosan films and nanofibers and similarly proliferated during the first few days (Figure 6c). On day 5, a significantly two-fold increased rate of [³H]-thymidine incorporation was noted on chitosan nanofibers as compared with films. Incorporation decreased on both substrates at day 7 but remained higher on nanofibers than on films, which probably reflects a better adhesion and spreading.

Keratinocyte Differentiation. A significant feature of keratinocytes is their differentiation program that affects their proliferation rate and modifies their pattern of proteins expression. Proliferative keratinocytes in culture express keratin 5 and keratin 14, which are markers for undifferentiated cell phenotype. When committed toward differentiation, suprabasal keratin 10 and involucrin and, later, filagrin and loricrin become expressed.²⁸ RT-PCR was performed to determine the expression levels of involucrin and keratins 10 and 14 as a way to evaluate the

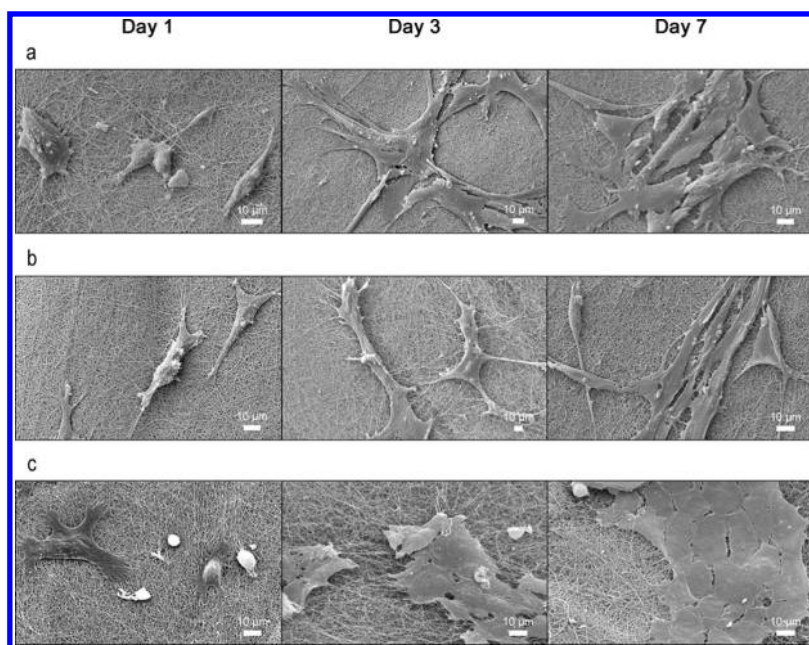


Figure 3. Scanning electron microscopy observation of human fibroblasts (a), microvascular endothelial cells (b), and keratinocytes (c) cultured on electrospun chitosan nanofibers for 1, 3, or 7 days.

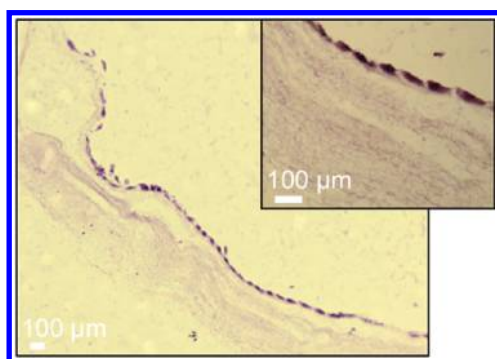


Figure 4. Confluent monolayer of keratinocytes cultured on electrospun chitosan nanofibers. Keratinocytes were cultured for 7 days on chitosan nanofibers, fixed, and embedded in paraffin. Hematoxylin/Eosin staining of transversal sections showing a continuous layer of contiguous cells.

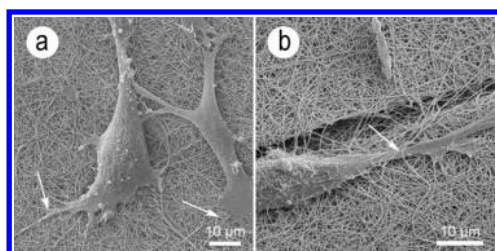


Figure 5. Fibroblasts interactions with chitosan nanofibers. Fibroblasts were cultured for 3 days on electrospun chitosan nanofibers, fixed, and processed for scanning electron microscopy. Some cell extensions interacting with individual or small groups of nanofibers (a, arrows) or progressively infiltrating the superficial layers of the biomaterial (b, arrow).

initiation of the differentiation process of keratinocytes under the different culture conditions (not shown). Keratin 14 expression

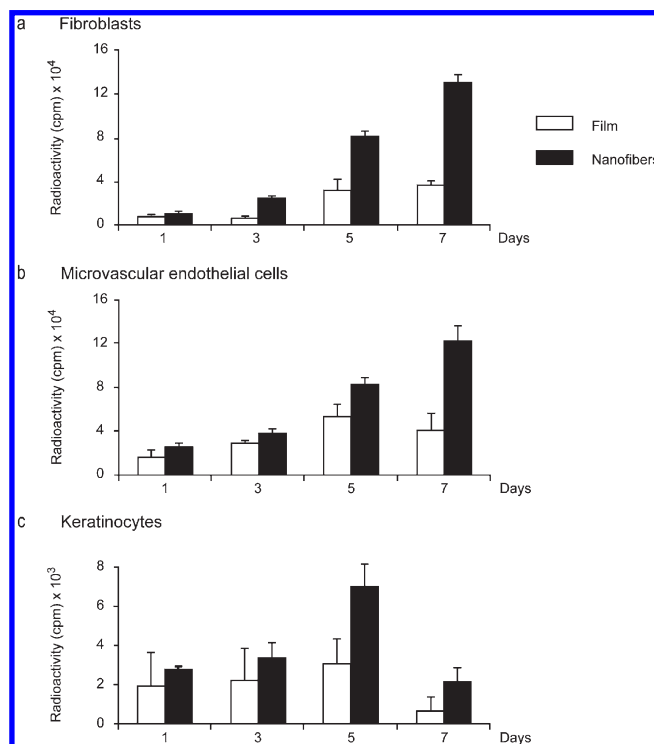


Figure 6. Cell proliferation on chitosan film and nanofibers. Human fibroblasts (a), microvascular endothelial cells (b), and keratinocytes (c) were cultured for increasing time (1 to 7 days) on a chitosan film or on a nanofibrous chitosan scaffold. A pulse of [³H]-thymidine was then performed for 6 h. Proliferation was evaluated by measuring the amount of radioactivity incorporated in DNA.

remained constant with time (day 7 up to day 21) in cultures on plastic in KGM-2, showing that these conditions do not induce differentiation. In contrast, its level slowly decreased when keratinocytes were cultured on chitosan nanofibers, indicating

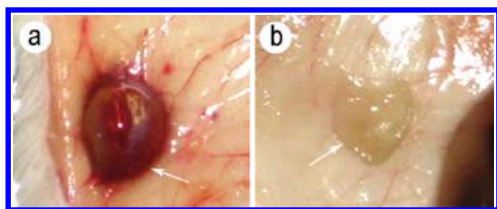


Figure 7. Macroscopic appearance of chitosan sponge (a) and electrospun nanofibers (b) 12 weeks after subcutaneous implantation. Sponges appear red and thickened by fibrous deposit, whereas nanofiber scaffolds remained white and could hardly be distinguished from the neighboring mouse tissue.

that they were becoming more prone to differentiation and confirming the biocompatibility and the absence of toxicity of chitosan nanofibers toward keratinocytes. This hypothesis was further confirmed by data showing a progressive increase in keratin 10 and involucrin expression in keratinocytes reaching confluence (between day 14 and 21) when cultured on nanofibers.

All together, these *in vitro* data clearly illustrate that interactions of cells with chitosan strongly depend on the structural architecture of the biomaterial. This most probably explains the large diversity of data reported in the literature regarding the use of chitosan *in vitro* in various cell culture models and demonstrates that nanofibrillar chitosan, but not chitosan film, is an efficient adhesive substrate for the three most important cell types involved in skin wound healing.^{36–38} This observation prompted us to evaluate its biological properties in mice *in vivo* using models of subcutaneous implantation or of full-thickness skin wound, which allows evaluation over long and short periods of time, respectively.³⁹

In Vivo Evaluation. *Biocompatibility.* Evaluation of the long-term potential toxicity or adverse side effect induced by a biomaterial requires specific *in vivo* models. Because cutaneous wounds in mice heal within 2 to 3 weeks, a model of subcutaneous implantation was used. Chitosan sponges and nanofiber scaffolds were evaluated because they both exhibit a 3-D structure but display a distinct architecture and porosity, giving the opportunity to establish a correlation between the structure of a biomaterial and its biocompatibility *in vivo*. It also allowed us to evaluate whether the differences for attachment and spreading observed *in vitro* between films and sponges on one hand and nanofibrillar scaffolds on the other hand have implications *in vivo*. Following implantation, mice recovered quickly and looked healthy during the entire experiment. Visual inspection of the implantation site did not reveal any local infection or inflammation. Blood samples were collected at increasing times after implantation. No circulating antibodies specific for chitosan were found by ELISA even 12 weeks after implantation confirming previous data and demonstrating that neither chitosan sponges nor nanofibers elicit a humoral immune response.^{40–42} Visual inspection after dissection showed that sponges and nanofiber scaffolds adhere similarly to the inner face of the skin. Their shape and size were not modified, and no obvious swelling or fluid accumulation was observed; however, sponges already appeared reddish at 1 week and were progressively surrounded by a thick fibrous capsule, whereas the nanofiber scaffolds were pale and seemed to be progressively integrated as self-material (Figure 7).

Histological analyses of the implanted scaffolds (Figure 8) indicate that chitosan sponges were never colonized by

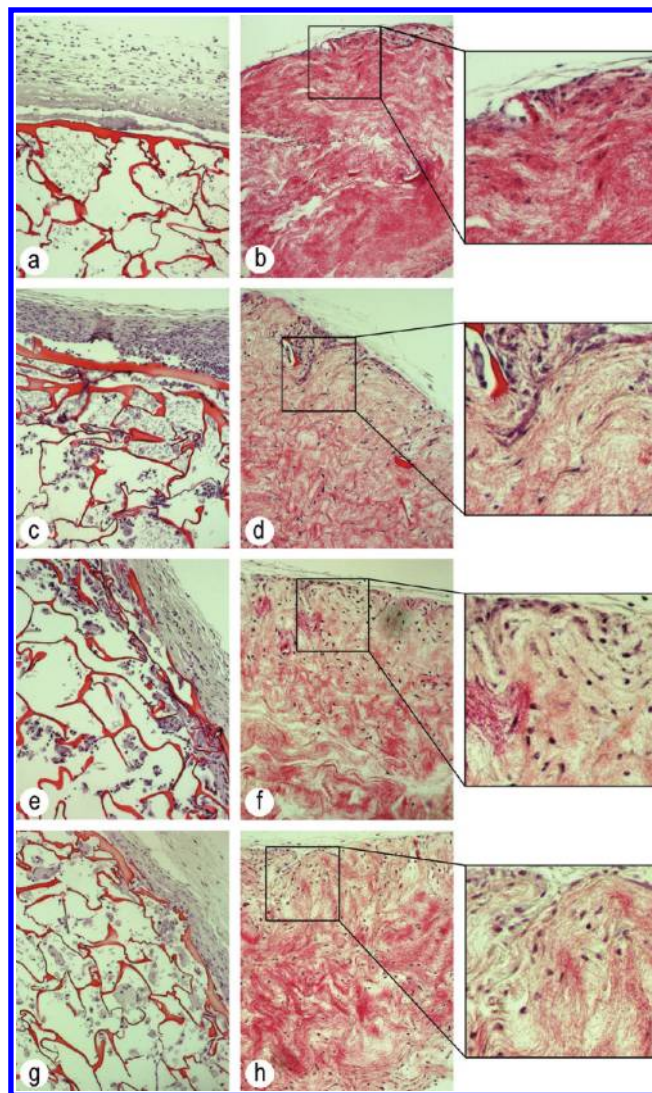


Figure 8. Histological examination of implanted biomaterials. Chitosan sponges (a,c,e,g) and electrospun scaffolds (b,d,f,h) were implanted subcutaneously and then collected after 1 (a,b), 4 (c,d), 8 (e,f), or 12 (g, h) weeks. After fixation and embedding in paraffin, sections were stained with hematoxylin/eosin. Chitosan appeared stained in red as loosely interconnected lamellae in sponges and as undulating bundles of thin structures in electrospun scaffold. A thick connective tissue capsule was already evidenced around sponges 1 week after implantation, whereas the inner space between lamellae remained essentially empty. Electrospun scaffolds were never encapsulated and were rapidly invaded by cells that followed the orientation of the chitosan nanofibers.

connective tissue cells (Figure 8a,c,e,g). By contrast, they induced the formation of a multilayered tissue capsule resembling foreign body granuloma, a host defense reaction to inert foreign material that is too large to be phagocytosed by macrophages.

When a scaffold composed of chitosan nanofibers was used, progressive cell invasion of the nanofibrillar material was already observed after 1 week of implantation (Figure 8b,d,f, h). A granuloma was never induced at the surface of the material, demonstrating a much better biocompatibility of chitosan nanofibers.

Qualitative analyses were also performed to characterize the nature of cells populating nanofiber scaffolds. Vimentin staining indicated that a large majority of invading cells were

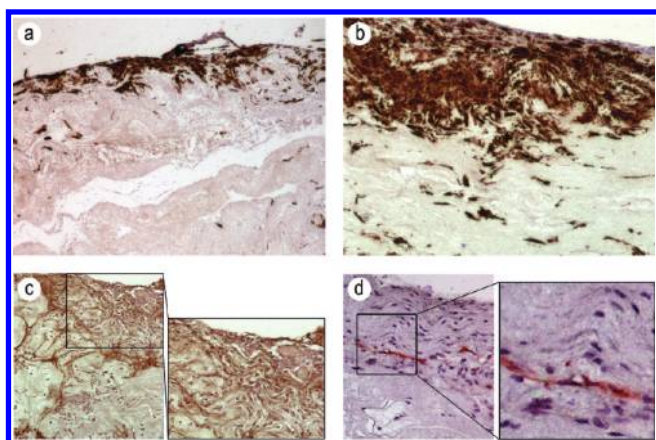


Figure 9. Colonization of chitosan nanofibrillar scaffolds by fibroblastic cells and blood vessels. The scaffolds were recovered 1 (a) and 12 (b–d) weeks after implantation, fixed, sectioned, and analyzed for the presence of fibroblastic cells stained for vimentin (a,b), a marker for cells of mesenchymal origin. A progressive infiltration of the electrospun scaffolds was clearly observed. Electrospun scaffolds collected 12 weeks after implantation were also analyzed for their fibrillar collagen content by using an antibody specific for type III collagen (c). Strong positivity was observed in regions colonized by fibroblastic cells. The newly deposited collagen structures tend to have the same orientation as the chitosan nanofibrillar structures. We also analyzed chitosan electrospun scaffolds by using an antitype IV collagen antiserum for visualization of the basement membrane that forms around blood vessels (d).

mesenchymal cells, such as fibroblasts (Figure 9a,b). By contrast again, sponges were essentially negative inside but strongly positive at the level of the surrounding capsule of connective tissue (Figure S2a,b, Supporting Information).

A strong inflammatory reaction characterized by a CD45 and a F4/80 staining, specific for, respectively, leukocytes and macrophages, was also evidenced for the sponges but not for nanofibers scaffolds (Figure S3, Supporting Information). It is also worth noting that the general orientation of the cells and the newly deposited collagen, as evidenced by type III collagen staining (Figure 9c), was strongly influenced by the undulating topography of the chitosan nanofibers that remarkably mimic the structure of the dermis. These data demonstrate that such a type of scaffold is able to dictate the architecture of the repairing tissues, therefore influencing its biomechanical properties, and could be most relevant for various applications in tissue engineering.

New blood vessel formation was also evaluated because it represents a critical step for full biocompatibility of implanted scaffolds by allowing long-term survival of invading cells. CD31, as a marker of endothelial cells, and type IV collagen, an essential component of basement membranes surrounding mature blood vessels, were stained with specific antibodies. Numerous vessels were detected within the connective tissue capsule surrounding the sponges but never in the sponge itself (Figures S2c and S3e, Supporting Information). By contrast they were present inside the electrospun scaffold after 12 weeks (Figure 9d; Figure S3f, Supporting Information) at a density that became progressively similar to what is found in a nonwounded mouse dermis. This further supports an ongoing process of remodeling and integration of the nanofibrillar material and its full biocompatibility.

Transmission electron microscopy was then performed to gain a better insight into the physical interactions between cells and

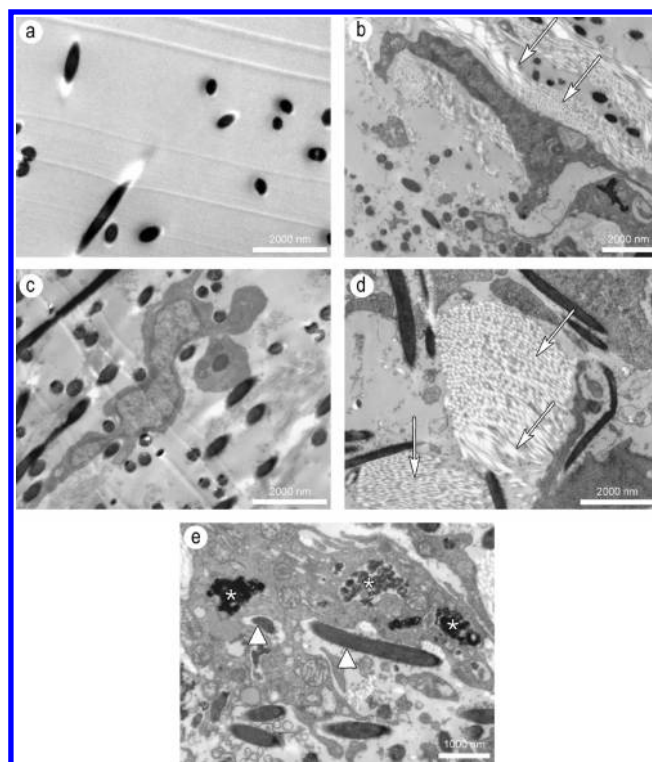


Figure 10. Transmission electron microscopy evaluation of implanted electrospun chitosan scaffold. In the chitosan scaffold before implantation, the nanofibers appear as elongated or circular black structures (a), depending upon their orientation. Twelve weeks after implantation elongated cells were detected (b). In most regions, they were constricted between many nanofibers (c). These cells secrete collagen visualized, under our staining conditions, as gray circular (cross section) or cylindrical structures (longitudinal section) (b,d, arrows). In many regions, these collagen bundles are also tightly associated with the chitosan scaffold (d). Some cells contain black disorganized structures (asterisks) that could represent intracellularly degraded nanofibers (e). The contour of chitosan nanofibers is less sharply delimited 12 weeks after implantation (arrowhead) as compared with control samples (a), suggesting either a progressive degradation of the nanofiber surface or coating by extracellular material.

chitosan biomaterials and into the mechanisms used by cells to invade a biomaterial with pores having a mean size of $<5 \mu\text{m}$. In electrospun scaffolds, chitosan nanofibers appeared as electron dense circular or elongated structures, depending on their relative orientation (Figure 10a). Twelve weeks after implantation, a significant proportion of the interfibrillar space contained fibroblast-like cells, as judged from their shape and the deposition of tightly packed collagen fibrils in their surroundings (Figure 10b). Most interestingly, fibroblastic cells and bundles of collagen fibrils were also in close contact with chitosan nanofibers (Figure 10c,d). As compared with the pictures before implantation (Figure 10a), the contour of nanofibers in implanted scaffolds was less sharply delineated, suggesting either an ongoing degradation process or progressive coating by extracellular macromolecules. Dark and irregular structures were also observed within some cells (Figure 10e), suggesting a process of endocytosis and intracellular degradation of chitosan.

Although some potential degradation of the nanofibers was suggested by a few pictures, degradation is obviously too limited to account for the fast colonization of the nanofibrillar network

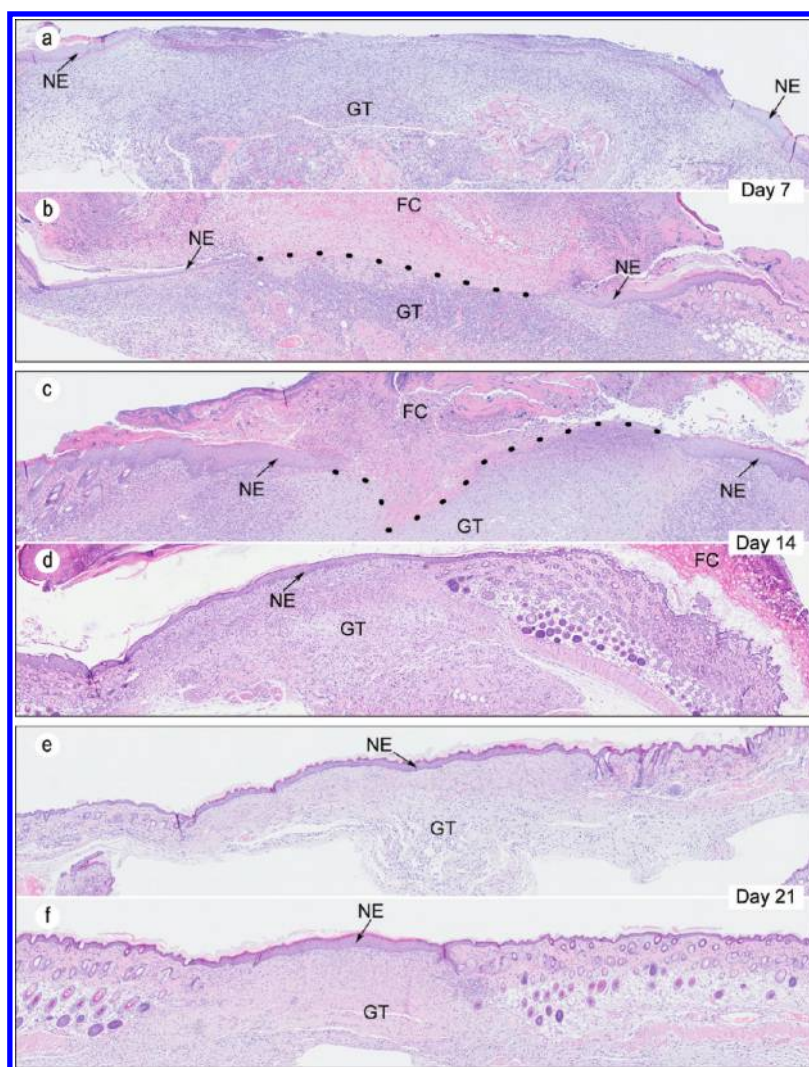


Figure 11. Effect of chitosan nanofibers dressings on wound healing. Full thickness wounds were performed in the back of mice ($n = 30$) and covered by a chitosan nanofiber dressing (b,d,f) or not (a,c,e). At day 7 (a,b), 14 (c,d), or 21 (e,f), the entire wounded areas, including surrounding skin, were harvested, fixed, embedded in paraffin, and analyzed after hematoxylin-eosin staining. The initial margins of the wounds are localized at the two extremities of the pictures. The fibrin clot (FC) sometimes detached during the section or the staining of the samples. The dotted lines mark the limit between FC and the granulation tissue (GT). The neoepidermis (NE) that progressively covers the GT is also indicated. The adnexae (hair bulbs, glands) that are present in the nonwounded skin appear as circular or elongated structures in the dermis depending in the angle of the sections.

by the host cells. Invasion probably results from two mechanisms. First, pictures show cells constricted between several chitosan nanofibers, suggesting that migration could occur through progressive narrowing of the entire cell body, including the nucleus.⁴³ Second, because the electrospun scaffold is a non-woven material formed by the accumulation of non-cross-linked nanofibers, displacement of the chitosan nanofibers may be expected and should favor cell migration, as also suggested in the Figure 5b. A further observation worth noting is the close interaction between the chitosan nanofibers, the invading cells, and the newly deposited collagen fibrils. This is in agreement with the collagen III staining and further demonstrates the full biocompatibility of this type of scaffold that is properly vascularized and progressively integrated as a host tissue.

Effect of Electrospun Chitosan Nanofibers Used As Dressing during Skin Wound Healing. Full thickness wounds (8 mm in diameter) were performed in the back skin of mice. The wounded areas, control or covered by a chitosan scaffold, were

collected at increasing time after skin excision and examined by microscopy after HE staining. Used as a dressing, chitosan nanofibers were found to adhere uniformly to freshly excised wound surface, to absorb the exudates, and to be fully biocompatible. As compared with controls, it was found to favor skin regeneration at different levels. At day 7, the control wound beds were characterized mostly by the presence of inflammatory cells in a poorly organized tissue (Figure 11a), whereas a progressive remodeling of the granulation tissue could already be observed in chitosan-treated wounds (Figure 11b). Furthermore, the surface covered by the newly formed epidermis appeared larger than in controls (Figure S4, Supporting Information). After 2 weeks, complete closure of the wound by the epidermal layer was observed only in the treated mice, which is a critical property for limiting risks of infection in clinical situations (Figure 11, compare c with d; Figure S4a, Supporting Information). Remarkable also in treated mice was the faster regeneration of hair follicles in the area corresponding to the initial wound

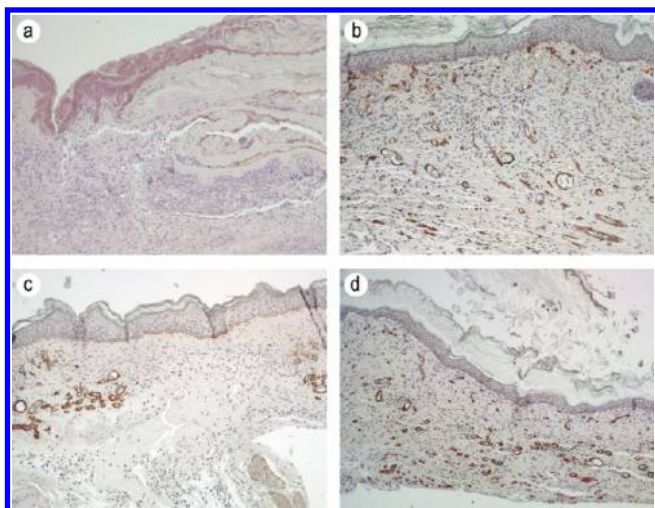


Figure 12. Blood vessel formation in wounded tissue. Blood vessels were visualized by using an antitype IV collagen antiserum. They were detected in the granulation tissue of chitosan-treated wounds (b,d) by days 14 and 21, whereas in control group they were absent by day 14 (a) and less abundant by day 21 (c).

(Figure 11e,f; Figure S4b, Supporting Information). A well-developed vascular network was also present in the chitosan-treated wounds at day 14, whereas it was almost completely absent in controls (Figure 12a,b). By day 21, most of the initial wound bed is replaced by a well-vascularized newly formed skin in treated mice, whereas such differentiated structures are still partially lacking in controls (Figure 12c,d). Although based on the analysis of a total number of only 30 mice, these studies provide complementary and converging data showing that nanofibrillar chitosan accelerates and improves the cutaneous healing process.

This improved regeneration of a functional skin, rather than just a repair process generating a poorly organized tissue, is of prime importance in several clinical situations characterized by extended skin loss such as that observed in deep ulcers and for patients with severe burns. The specific mechanisms involved in the beneficial prohealing activity observed here remain to be firmly identified, but they are likely influenced by the nanofibrillar structure of the chitosan. The presence of such structures has indeed several direct and indirect consequences. It markedly increases the specific surface of the material, which, in turn, could (i) favor the trapping of factors detrimental to the repair process when present in excess (proteases, reactive oxygen species, etc.), (ii) stimulate the progressive release of chitosan fragments that are reported to recruit and activate leukocytes and mesenchymal cells,⁴⁴ and (iii) increase the surface available for protein coating and cell adhesion. A nanofibrillar structure also strongly affects the stiffness of the material, a critical property that strongly regulates the phenotype and the differentiation process of many cell types through regulatory pathways involving mechanosensing.^{31,45} It is also worth noting that the nanoscale topography itself modifies the cytoskeleton organization and the cell phenotype, probably by affecting the pattern of cell adhesion.^{46,47} Of particular interest, it has been recently shown, using poly-L-lactic acid (PLLA) or polycaprolactone (PCL), that the structure and the organization of fibers regulate macrophage activation in vitro⁴⁸ and immune response in vivo.⁴⁹

CONCLUSIONS

Despite many data, sometimes conflicting, indicating that chitosan could be a valuable biomaterial for improving wound healing, this work represents the first integrated study investigating specifically several complementary aspects of the use of chitosan as a wound dressing for cutaneous lesions. A chitosan scaffold produced by accumulation of electrospun nanofibers is a much better substrate for adhesion, growth, and differentiation of the three main skin cell types (keratinocytes, fibroblasts, and endothelial cells) than other types of chitosan device (films, sponges, gel, etc.). Moreover, long-term evaluations demonstrate its full biocompatibility and its progressive integration and colonization in vivo by contrast with the lamellar 3-D chitosan sponge that elicits the formation of a foreign body granuloma. In addition, our results show that the structure and the orientation of the nanofibrillar network dictate the invasion and remodeling process and therefore the architecture and mechanical properties of the newly formed tissue. Chitosan nanofibers also promote the recovery of full thickness wounds, as illustrated by an improved re-epithelialization process, an enhanced vascularization, and a more efficient remodeling of the granulation tissue. These data clearly indicate that electrospun chitosan scaffold is a promising biomaterial with highly desirable properties for various applications in tissue engineering and wound dressing, especially for the treatment of deep ulcers that would benefit from the 3-D scaffold filling the entire wound and being progressively incorporated in the repairing tissue.

ASSOCIATED CONTENT

S Supporting Information. Thermal behavior of pure PEG, pure chitosan, and electrospun scaffold before and after stabilization; connective tissue capsule formed 1 week and 12 weeks after implanting a chitosan sponge, after staining of vimentin to visualize fibroblastic cells, and of type IV collagen to visualize the basement membrane lining the blood vessels; staining of leukocytes, macrophages, and endothelial cells using specific antibodies for CD45, F4/80, and CD31, respectively, in chitosan sponges or nanofibrillar scaffolds recovered 12 weeks after subcutaneous implantation, and rate of wound closure by the new epidermis and of hair follicles regeneration at 7, 14 and 21 days after full thickness skin excision. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: acolige@ulg.ac.be.

Author Contributions

These authors contributed equally to this work.

ACKNOWLEDGMENT

We thank the Région wallonne (DG06) for its support (GoCell project, grant nos. 516025 and 616262). The antichitosan antibody is a generous gift of Daniel Hartmann, Laboratoire des Biomateriaux et Remodelages Matriciels, EA 3090, Lyon, France.

REFERENCES

- (1) Kanitakis, J. *Eur. J. Dermatol.* **2002**, *12*, 390–399; quiz 400–391.
- (2) Metcalfe, A. D.; Ferguson, M. W. *Biomaterials* **2007**, *28*, S100–S113.

- (3) Rippon, M.; Davies, P.; White, R.; Bosanquet, N. *J. Wound Care* **2008**, *17*, 224–227.
- (4) Sen, C. K.; Gordillo, G. M.; Roy, S.; Kirsner, R.; Lambert, L.; Hunt, T. K.; Gottrup, F.; Gurtner, G. C.; Longaker, M. T. *Wound Repair Regen.* **2009**, *17*, 763–771.
- (5) Clark, R. A.; Ghosh, K.; Tonnesen, M. G. *J. Invest. Dermatol.* **2007**, *127*, 1018–1029.
- (6) Falanga, V. *J. Adv. Skin Wound Care* **2000**, *13*, 15–19.
- (7) Davidson, J. M. *J. Hand Ther.* **1998**, *11*, 80–94.
- (8) Theoret, C. L. *Vet. Clin. North Am.: Equine Pract.* **2005**, *21*, 1–13.
- (9) Eming, S. A.; Krieg, T.; Davidson, J. M. *J. Invest. Dermatol.* **2007**, *127*, S14–S25.
- (10) Hinz, B. *J. Invest. Dermatol.* **2007**, *127*, S26–S37.
- (11) Boateng, J. S.; Matthews, K. H.; Stevens, H. N.; Eccleston, G. M. *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97*, 2892–2923.
- (12) Zhong, S. P.; Zhang, Y. Z.; Lim, C. T. *Wiley Interdiscip. Rev.: Nanomed. Nanobiotechnol.* **2010**, *2*, 510–525.
- (13) Chern, P. L.; Baum, C. L.; Arpey, C. J. *Dermatol. Surg.* **2009**, *35*, 891–906.
- (14) Kim, I. Y.; Seo, S. J.; Moon, H. S.; Yoo, M. K.; Park, I. Y.; Kim, B. C.; Cho, C. S. *Biotechnol. Adv.* **2008**, *26*, 1–21.
- (15) Khor, E.; Lim, L. Y. *Biomaterials* **2003**, *24*, 2339–2349.
- (16) Ignatova, M.; Manolova, N.; Markova, N.; Rashkov, I. *Macromol Biosci* **2009**, *9*, 102–111.
- (17) Huang, Y.; Onyeri, S.; Siewe, M.; Moshfeghian, A.; Madihally, S. V. *Biomaterials* **2005**, *26*, 7616–7627.
- (18) Ma, L.; Gao, C.; Mao, Z.; Zhou, J.; Shen, J.; Hu, X.; Han, C. *Biomaterials* **2003**, *24*, 4833–4841.
- (19) Mi, F.-L.; Shyu, S.-S.; Wu, Y.-B.; Lee, S.-T.; Shyong, J.-Y.; Huang, R.-N. *Biomaterials* **2001**, *22*, 165–173.
- (20) Khan, T. A.; Peh, K. K. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2003**, *6*, 20–26.
- (21) Chatelet, C.; Damour, O.; Domard, A. *Biomaterials* **2001**, *22*, 261–268.
- (22) Shim, I. K.; Suh, W. H.; Lee, S. Y.; Lee, S. H.; Heo, S. J.; Lee, M. C.; Lee, S. J. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **2009**, *90*, 595–602.
- (23) Bhattarai, N.; Edmondson, D.; Veisheh, O.; Matsen, F. A.; Zhang, M. *Biomaterials* **2005**, *26*, 6176–6184.
- (24) Hamilton, V.; Yuan, Y.; Rigney, D. A.; Puckett, A. D.; Ong, J. L.; Yang, Y.; Elder, S. H.; Bumgardner, J. D. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **2006**, *17*, 1373–1381.
- (25) Berrier, A. L.; Yamada, K. M. *J. Cell. Physiol* **2007**, *213*, S65–S73.
- (26) Pedersen, J. A.; Swartz, M. A. *Ann. Biomed. Eng.* **2005**, *33*, 1469–1490.
- (27) Schultz, G. S.; Wysocki, A. *Wound Repair Regen.* **2009**, *17*, 153–162.
- (28) Minner, F.; Herphelin, F.; Poumay, Y. *Methods Mol. Biol.* **2010**, *585*, 71–82.
- (29) Tchetchoua, V. T.; Atanasova, G.; Aqil, A.; Maquet, V.; Jerome, C.; Poumay, Y.; Colige, A. *Anal. Biochem.* **2009**, *393*, 145–147.
- (30) Pochanavanich, P.; Suntornsuk, W. *Lett. Appl. Microbiol.* **2002**, *35*, 17–21.
- (31) Chiquet, M.; Gelman, L.; Lutz, R.; Maier, S. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1793*, 911–920.
- (32) Discher, D. E.; Mooney, D. J.; Zandstra, P. W. *Science* **2009**, *324*, 1673–1677.
- (33) Widgerow, A. D. *Wound Repair Regen.* **2011**, *19*, 117–133.
- (34) Marastoni, S.; Ligresti, G.; Lorenzon, E.; Colombatti, A.; Mongiat, M. *Connect Tissue Res.* **2008**, *49*, 203–206.
- (35) Kim, S. H.; Turnbull, J.; Guimond, S. *J. Endocrinol.* **2011**, *209*, 139–151.
- (36) Howling, G. I.; Dettmar, P. W.; Goddard, P. A.; Hampson, F. C.; Dornish, M.; Wood, E. J. *Biomaterials* **2001**, *22*, 2959–2966.
- (37) Zhou, Y.; Yang, D.; Chen, X.; Xu, Q.; Lu, F.; Nie, J. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 349–354.
- (38) Neamark, A.; Sanchavanakit, N.; Pavasant, P.; Rujiravanit, R.; Supaphol, P. *Eur. Polym. J.* **2008**, *44*, 2060–2067.
- (39) Vogt, J. C.; Brandes, G.; Kruger, I.; Behrens, P.; Nolte, I.; Lenarz, T.; Stieve, M. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **2008**, *19*, 2629–2636.
- (40) VandeVord, P. J.; Matthew, H. W.; DeSilva, S. P.; Mayton, L.; Wu, B.; Wooley, P. H. *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, *59*, 585–590.
- (41) Mi, F. L.; Tan, Y. C.; Liang, H. F.; Sung, H. W. *Biomaterials* **2002**, *23*, 181–191.
- (42) Sorlier, P.; Hartmann, D. J.; Denuziere, A.; Viton, C.; Domard, A. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **2003**, *67*, 766–774.
- (43) Friedl, P.; Wolf, K. *J. Cell Biol.* **2010**, *188*, 11–19.
- (44) Ueno, H.; Mori, T.; Fujinaga, T. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *52*, 105–115.
- (45) Schwartz, M. A. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* **2010**, *2*, a005066.
- (46) Yang, Y.; Leong, K. W. *Wiley Interdiscip. Rev.: Nanomed. Nanobiotechnol.* **2011**, *2*, 478–495.
- (47) Yim, E. K.; Darling, E. M.; Kulangara, K.; Guilak, F.; Leong, K. W. *Biomaterials* **2010**, *31*, 1299–1306.
- (48) Saino, E.; Focarete, M. L.; Gualandi, C.; Emanuele, E.; Cornaglia, A. I.; Imbriani, M.; Visai, L. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 1900–1911.
- (49) Cao, H.; McHugh, K.; Chew, S. Y.; Anderson, J. M. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **2009**, *93*, 1151–1159.

III.2 CHAPITRE 2 : CARACTERISATION DES PROPRIETES BIOLOGIQUES DES PROTEINES CHIMERIQUES

Introduction

La cicatrisation est un processus hautement dynamique et interactif impliquant divers types de cellules mais aussi leurs interactions spécifiques avec la matrice extracellulaire et des facteurs diffusibles [86]. Toute perturbation d'un de ces mécanismes est donc susceptible d'induire des retards de cicatrisation, voire d'aboutir à des plaies chroniques. Lors de la conception initiale de notre pansement, il avait été décidé de chercher à améliorer ses propriétés intrinsèques en vue d'une utilisation thérapeutique pour le traitement des ulcères cutanés. Deux types de « bio-activation » avaient été envisagés. Le premier avait pour but de favoriser les interactions entre les cellules et la matrice de chitosane, en y « greffant » des motifs d'adhésion cellulaire, alors que le deuxième visait à stimuler la cicatrisation par immobilisation de facteurs de croissance régulant le phénotype des cellules les plus directement impliquées dans les processus de réparation cutanée.

Différentes stratégies visant à immobiliser des protéines à la surface du chitosane avaient été envisagées dont notamment leur fixation par des agents chimiques ou leur mélange au sein de la solution de chitosane avant électrofilage. Ces options ont été rapidement écartées car elles présentent des désavantages majeurs. On pourrait citer, par exemple, la modification des propriétés physico-chimiques des nanofibres et la perte d'activité de nos molécules biologiques résultant de l'action non maîtrisée des agents pontants, des pH acides requis pour la mise en solution du chitosane ou de leur orientation inappropriée à la surface du biomatériau. Pour pallier ces problèmes, il avait été décidé de développer une stratégie alternative. Celle-ci a consisté à produire les médiateurs biologiques sous la forme de protéines chimériques dont la particularité est de comporter des domaines distincts : un domaine ayant une affinité élevée pour le chitosane et le médiateur biologique proprement dit (facteur de croissance par exemple), éventuellement séparés par une séquence dérivée de l'élastine chargée d'assurer la flexibilité de la molécule et une certaine indépendance structurelle des deux autres domaines (Fig. 24).

La tâche du LBTC dans cette partie du projet était essentiellement d'évaluer les propriétés biologiques des différentes protéines chimériques produites par notre partenaire (Centre d'Ingénierie des Protéines).

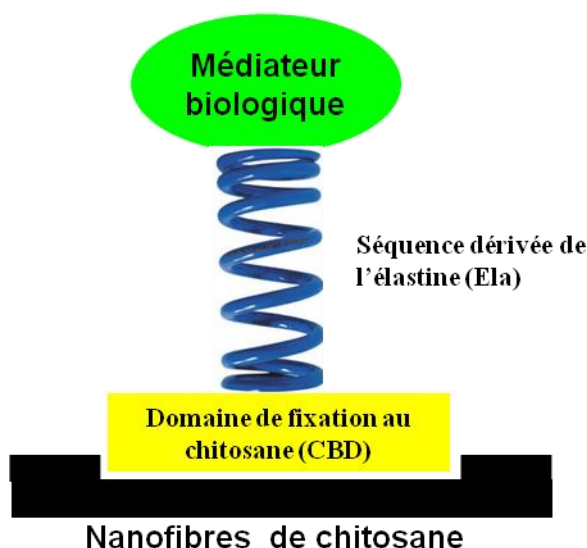


Fig. 24. Représentation du prototype idéal du système d'immobilisation orientée.

Ce n'est que récemment que des séquences peptidiques présentant une certaine affinité pour le chitosane ont pu être identifiées par criblage d'une banque aléatoire de phages sur une matrice de chitosane. Cette étape cruciale n'ayant été réalisée que tardivement dans le projet, les caractérisations servant de « preuves de concept » ont été essentiellement effectuées sur des protéines chimériques possédant un domaine de liaison à la chitine que nous espérons modifier et faire évoluer pour lui conférer une affinité pour le chitosane (Fig. 25).



Fig. 25 : Structure générale des protéines chimériques recombinantes produites par le CIP.

Protéines chimériques contenant des motifs d'adhésion cellulaire GRGDS (a) et des facteurs de croissance (b). CBD : motif de fixation à la chitine ; Pept11 : motif de fixation au chitosane ; GRGDS₅/GRGDS₄₀ : motif GRGDS répété 5 et 40 fois ; Ela : séquence de l'élastine humaine.

III.2.1 MOTIFS D'ADHESION CELLULAIRE

Contexte

Les cellules possèdent à leur surface un répertoire spécifique d'intégrines qui influencent le phénotype cellulaire en fonction des interactions qui s'établissent avec les différents composants de la MEC [97]. Parmi les différentes intégrines, plusieurs d'entre-elles reconnaissent un motif d'adhésion minimum RGD (Arg-Gly-Asp) qui se retrouve dans de nombreuses protéines matricielles (fibronectine, vitronectine, ostéopontine, fibrinogène,

thrombospondine, facteur de Von Willebrand,...) [180]. Ces interactions sont toutefois dépendantes du contexte tridimensionnel et des séquences adjacentes, ce qui explique que le tripeptide RGD n'a qu'une affinité limitée pour les intégrines lorsqu'il se présente en dehors de tout contexte protéique, en solution par exemple. Diverses publications ont montré qu'un polypeptide recombinant formé par la répétition d'un pentapeptide **GRGDS** était un bien meilleur ligand pour les intégrines que le simple tripeptide RGD. C'est donc cette configuration que nous avons décidé d'étudier plus en détail au cours de notre travail.

Résultats

La première protéine chimérique destinée à favoriser l'adhésion cellulaire comportait 5 répétitions de la séquence GRGDS liées au domaine de liaison à la chitine (CBD-GRGDS₅). Ses propriétés ont été évaluées dans un modèle d'adhésion et d'étalement de fibroblastes et de cellules endothéliales microvasculaires (HMEC). Son efficacité a été comparée à celle de la fibronectine et de l'albumine bovine, utilisées en tant que témoins positif et négatif, respectivement. Dans ce modèle expérimental, les disques de culture sont préalablement saturés avec les protéines étudiées de manière à former un film moléculaire servant de substrat d'adhésion et d'étalement. Comme attendu, les deux types cellulaires adhèrent sur le plastique de culture et s'étalent rapidement sur fibronectine, mais n'adhèrent pas et restent arrondis sur l'albumine. Dans le cas du CBD-GRGDS₅, on observait un attachement significatif mais largement inférieur à celui mesuré pour la fibronectine (non montré). Afin d'améliorer les propriétés du facteur d'adhésion, une nouvelle protéine chimérique, contenant cette fois 40 répétitions de GRGDS (CBD-GRGDS₄₀) a été produite, puis évaluée dans le même modèle expérimental. Les observations précédentes réalisées pour les cultures sur plastique, fibronectine et albumine ont été confirmées, illustrant la fiabilité de notre modèle. En absence de sérum, condition qui ralentit l'étalement des cellules, on remarque que, après 6h de culture, l'attachement et surtout l'étalement des cellules endothéliales et des fibroblastes demeurent limités sur un substrat de CBD-GRGDS₅ (Fig. 26). À l'inverse, le CBD-GRGDS₄₀ est presque aussi efficace que la fibronectine, réputée pour être un facteur d'adhésion et d'étalement très performant. Des mesures ont également été effectuées à des temps plus longs notamment par quantification d'ADN afin d'estimer le nombre de cellules adhérentes (Fig. 27). Ces mesures confirment largement les évaluations morphologiques réalisées après 6h de culture et démontrent qu'aux temps plus longs le CBD-GRGDS₅ possède une efficacité non négligeable même si elle demeure moindre que celle du CBD-GRGDS₄₀.

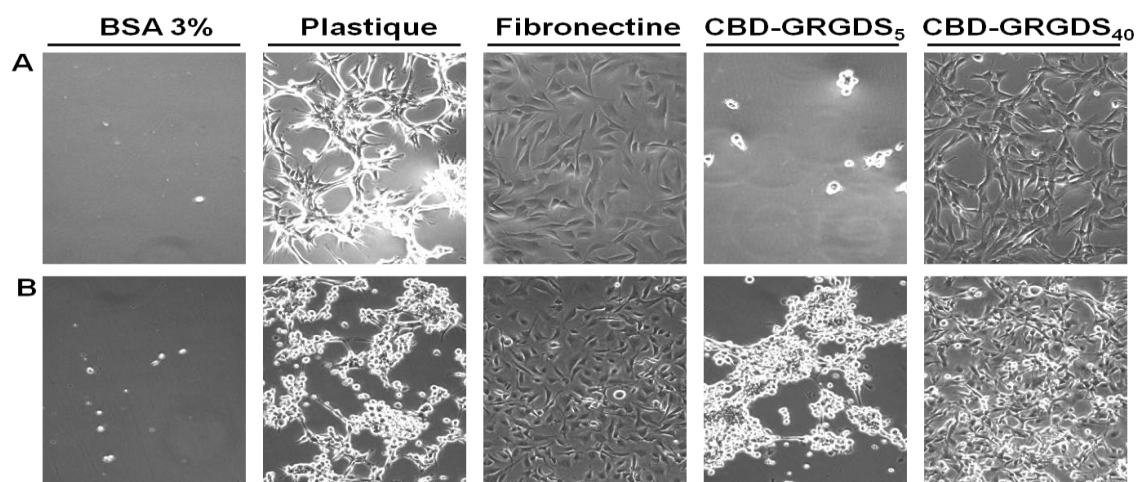


Fig. 26 : Evaluation de l'attachement et de l'étalement de fibroblastes (A) et des cellules endothéliales (B) sur différents substrats de culture. Les cultures ont été réalisées, en absence de sérum, sur plastique de culture non traité ou saturé par de l'albumine bovine (BSA) utilisée comme témoin négatif, de la fibronectine (une protéine contenant la séquence d'adhésion cellulaire RGD et utilisée comme témoin positif), du CBD-GRGDS₅ et du CBD-GRGDS₄₀. Le traitement des disques de culture s'est réalisé de la manière suivante. Les solutions protéiques (350 μ l à 14 μ g/ml de PBS) sont incubées dans des disques durant 1 nuit à 4°C. Après lavage, tous les puits ayant été traités par une protéine sont ensuite incubés avec une solution de BSA 3% (2h à 37°C) afin de saturer d'éventuels sites résiduels de fixation. Après 3 nouveaux lavages par le PBS, les puits ont étéensemencés avec 60 x 10³ cellules dans du milieu de culture sans sérum. L'attachement et l'étalement cellulaires ont été suivis au cours du temps. Seules les photographies des cellules adhérentes au temps 6h sont montrées.

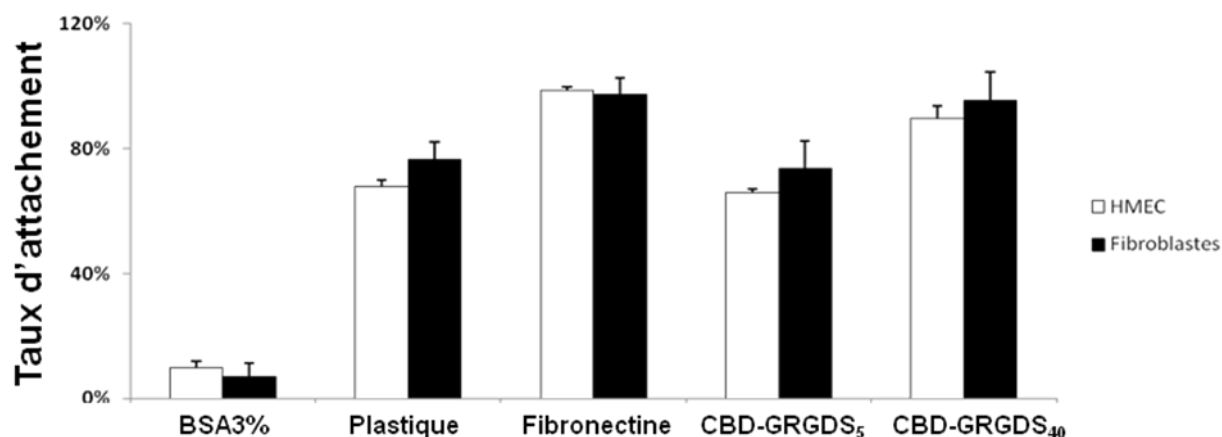


Fig. 27 : Evaluation de l'attachement cellulaire par mesure d'ADN.

Après 24 h de culture à 37°C sur les différents substrats (voir légende de la figure 26), des lavages ont été réalisés afin d'éliminer les cellules flottantes ou peu adhérentes. Les couches cellulaires ont été ensuite récoltées et des mesures d'ADN ont été effectuées afin de permettre une estimation relative du taux de cellules attachées sur les différents supports par rapport au nombre initial de cellulesensemencées.

Sur base de ces résultats encourageants, nous avons également vérifié si le CBD-GRGDS₄₀ était capable de favoriser l'attachement cellulaire sur un film de chitosane. Aucune

amélioration notable n'a été observée (non montré), ce qui n'est pas surprenant puisque le domaine CBD a une affinité élevée pour la chitine mais bien moindre pour le chitosane.

Suite à l'identification récente d'une séquence peptidique possédant une affinité significative pour le chitosane (Pept11), il avait été décidé de répéter certaines expériences clés pour évaluer les propriétés d'une nouvelle protéine chimérique d'adhésion contenant la séquence Pept11 en lieu et place de la séquence CBD (voir Fig. 25). Dans un modèle classique d'adhésion cellulaire sur des protéines immobilisées sur plastique, la protéine Pept11-GRGDS₄₀ est aussi efficace que le CBD-GRGDS₄₀ (Fig. 28A). Lorsque ces expériences sont répétées non plus sur plastique mais sur des films de chitosane, aucune adhésion cellulaire significative n'est observée (Fig. 28B), que ce soit sur chitosane non traité ou préalablement incubé avec les différentes protéines. Ceci démontre, de manière indirecte, que même le Pept11-GRGDS₄₀ n'est pas capable de se fixer efficacement ou durablement sur un film de chitosane.

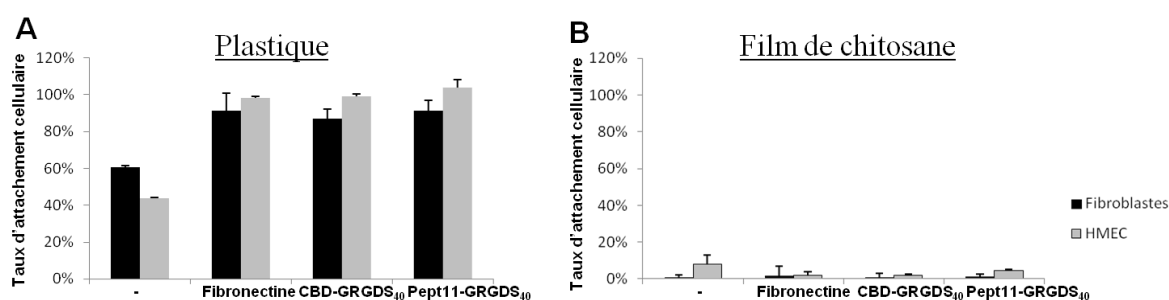


Fig. 28 : Evaluation du taux d'attachement des fibroblastes et de cellules endothéliales sur plastique de culture (A) et film de chitosane (B) préalablement saturés par de la fibronectine, du CBD-GRGDS₄₀ ou du Pept11-GRGDS₄₀.

La saturation du plastique de culture ou du film de chitosane a été réalisée tel que décrit à la figure 24. Le film de chitosane a été obtenu par évaporation d'1ml d'une solution de chitosane (1% dans l'acide acétique 1%). Après séchage, le film est neutralisé et abondamment rincé. Après 24 h de culture, des lavages sont réalisés afin d'éliminer les cellules flottantes. Les cellules adhérentes sont ensuite incubées pendant 3h en présence de WST-1, de manière à estimer les taux relatifs de cellules attachées sur les différents supports par rapport au nombre initial de cellulesensemencées.

Brève conclusion

Notre tâche au cours de cette partie du projet était d'estimer l'efficacité de protéines chimériques destinées à favoriser les interactions entre les cellules et le chitosane. Dans un modèle expérimental classique où la protéine est immobilisée sur plastique, la répétition d'un nombre suffisant de motifs pentapeptidiques GRGDS permet une adhésion et un étalement très efficace des cellules endothéliales et des fibroblastes, ce qui démontre la pertinence de notre concept. Par contre, le peu d'efficacité de liaison au chitosane des domaines CBD et

Pept11 empêche pour l'instant d'évaluer l'impact qu'aurait la présence de tels motifs d'adhésion s'ils étaient immobilisés sur le chitosane ou, plus particulièrement, au sein de notre pansement nanofibrillaire.

III.2.2 FACTEURS DE CROISSANCE

Comme dans le cas des intégrines, chaque type cellulaire se caractérise également par un répertoire de récepteurs pour les facteurs de croissance ainsi que par leur abondance relative, ce qui permet des régulations cellulaires potentiellement très spécifiques. Parmi les facteurs de croissance les plus significativement impliqués dans la cicatrisation, on retrouve le VEGF, le FGF-2 et l' HB-EGF. Ceux-ci sont plus spécifiquement, mais non exclusivement, capables de réguler les propriétés des cellules endothéliales (VEGF et FGF-2), des fibroblastes (FGF-2 et HB-EGF) et des kératinocytes (HB-EGF).

D'autres facteurs de croissance n'ont pas été retenus pour notre étude pour diverses raisons dont, par exemple, un effet moindre sur les cellules cibles ou des difficultés concernant leur production sous forme recombinante. Une autre considération prise en compte est leur résistance à l'action de diverses protéases puisque l'ulcère cutané est un environnement riche en plasmine et MMPs. C'est ainsi qu'une des causes avancées pour expliquer la relative inefficacité du traitement des ulcères par le PDGF est une dégradation rapide empêchant tout effet marqué. C'est dans ce contexte que nous avons choisi d'utiliser l'isoforme 111 du VEGF-A (VEGF111) parce qu'elle présente la particularité d'être très peu sensible aux protéases présentes dans les exsudats d'ulcères comme nous l'avons montré précédemment [157] alors que les autres isoformes, dont les VEGF165 et 121 par exemple, sont très rapidement dégradées et inactivées.

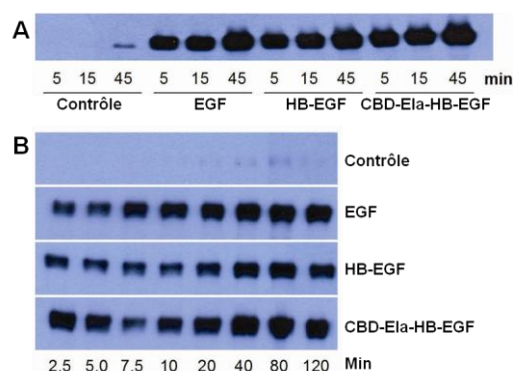
La caractérisation des facteurs de croissance chimériques développés au cours de ce projet visait à s'assurer de leur activité biologique puisque celle-ci pourrait être significativement réduite suite au mode de production en bactéries, à des contraintes liées à leur purification à partir des corps d'inclusion, mais surtout en raison de la présence des domaines CBD (ou pept 11) et Ela (voir Fig. 23). Leur activité et celle du facteur de croissance non-chimérique correspondant ont donc été déterminées et comparées dans deux modèles expérimentaux complémentaires *in vitro*. Nous avons évalué l'induction de la phosphorylation d'un récepteur spécifique pour chaque facteur, ce qui est le signe le plus précoce de son activité. Nous avons également mesuré la prolifération d'un ou plusieurs types cellulaires pertinents après leur mise en contact pendant des temps plus longs avec les différents facteurs afin d'estimer un paramètre de physiologie cellulaire et non plus seulement l'activation d'un signal biochimique.

III.2.2.1 HB-EGF chimérique recombinant (CBD-Ela-HB-EGF)

Activation de l'EGFR-1

Pour des raisons de sensibilité de la technique, les mesures de phosphorylation du récepteur induite par le CBD-Ela-HB-EGF n'ont pas été évaluées sur des cellules primaires mais bien sur des cellules humaines de carcinome épidermoïde (A431) ayant pour particularité de posséder un grand nombre d'EGF-R1 à leur surface, de l'ordre de $1 \text{ à } 3 \times 10^6/\text{cellule}$. L'EGF et l'HB-EGF commercialement disponibles ont été utilisés comme références. Au cours d'essais préliminaires (non montrés), nous avons déterminé que des taux similaires de phosphorylation de l'EGF-R1 pouvaient être obtenus lorsque les cellules étaient traitées avec, respectivement, 10, 30 et 90 ng / ml d'EGF, d'HB-EGF ou de CBD-Ela-HB-EGF. Ces concentrations ont par la suite été utilisées au cours de diverses expériences de cinétique (Fig. 29A et B) qui démontrent les propriétés similaires des trois types de facteurs de croissance testés.

Fig. 29: Phosphorylation du récepteur 1 pour l'EGF (EGF-R1). Les mesures de phosphorylation du récepteur 1 pour l'EGF (EGF-R1) ont été réalisées en utilisant des cellules humaines de carcinome épidermoïde (A431). Celles-ci ont été cultivées dans du milieu DMEM contenant 10% de sérum. Une fois à confluence, elles ont été privées de sérum pendant 6h puis incubées pendant 5, 15 ou 45 min en absence de facteur de croissance ou en présence d'EGF (10 ng/ml), d'HB-EGF (30 ng/ml) ou de CBD-HB-EGF (90 ng/ml) (A). Une gamme plus étendue de temps d'incubation a également été évaluée (B). L'analyse des lysats cellulaires par Western blot a été réalisée à l'aide d'un anticorps dirigé contre les phospho-tyrosine (PY99) de l'EGFR1.



Stimulation de la prolifération cellulaire

Deux souches de fibroblastes de peau et des cellules endothéliales (HUVEC) ont été utilisées en raison de leur pertinence dans notre projet de recherche, l'étude des kératinocytes étant réalisée dans un laboratoire partenaire (LabCeTi). L'effet sur la prolifération cellulaire a été évalué par mesure d'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN. Des concentrations de l'ordre de 25 ng/ml induisent un effet maximal pour les 3 formes testées du facteur (non montré) et l'effet est plus marqué sur les fibroblastes que sur les cellules endothéliales (Fig. 30), ce qui était attendu au vu des données de la littérature.

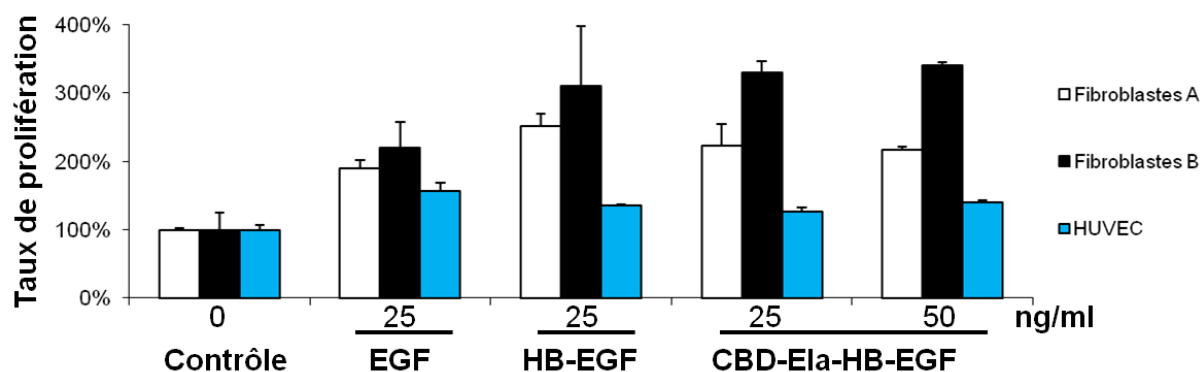


Fig. 30: Effet du CBD-Ela-HB-EGF et des facteurs de croissance de référence sur la prolifération de fibroblastes humains de nouveau-né (A) et d'adulte (B), et de cellules endothéliales (HUVEC).

Les HUVECs sont ensemencées sur gélatine dans le milieu MCDB131 contenant 20% de sérum alors que les fibroblastes sont ensemencés sur plastique dans le milieu DMEM contenant 10% de sérum. Une fois les cultures de fibroblastes parvenues à 80% de confluence, ou 4h après ensemencement dans le cas des HUVECS, les différents milieux sont remplacés par du milieu contenant 0.2% de sérum, de l'héparine (5µg/ml) et les concentrations indiquées en facteurs de croissance (EGF, HB-EGF, CBD-Ela-HB-EGF). Après 24 et 48 h de culture respectivement pour les fibroblastes et les HUVECs, les milieux sont renouvelés et de la thymidine tritiée (1µM, 2.5 Ci/mol) est ajoutée. Dix huit heures plus tard, la couche cellulaire est récoltée, l'ADN est précipité (TCA 10%, à froid) et la radioactivité qui y est associée est mesurée par scintillation liquide. Contrôle : milieu de culture sans facteur de croissance ; EGF : EGF commercial ; HB-EGF : HB-EGF commercial ; CBD-Ela-HB-EGF : protéine chimérique recombinante.

Brèves conclusions

L'activation à court terme de l'EGF-R1 semble moins efficace avec le CBD-Ela-HB-EGF qu'avec les facteurs de référence puisque des concentrations plus élevées sont requises pour obtenir une phosphorylation similaire. Aucune différence significative n'est toutefois notée en terme de prolifération cellulaire. Cette différence pourrait être due au fait que les cellules utilisées ne sont pas identiques dans les deux modèles, les cellules A431 possédant un nombre extrêmement élevé d'EGF-R1, soit 10 à 100 fois supérieur à celui de la plupart de lignées cellulaires. La présence de protéoglycanes spécifiques à la surface ou à proximité immédiate des cellules pourrait être une autre explication puisqu'il est connu que nombre d'entre-eux modifient et régulent l'interaction entre l'HB-EGF et ses récepteurs.

III.2.2.2 FGF-2 chimérique recombinant (CBD-Ela-FGF-2)

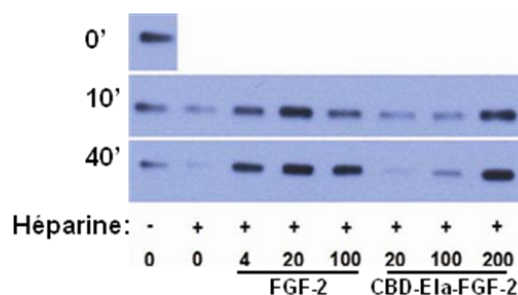
Activation du FGF-R1

Le FGF-R1 est le principal récepteur pour le FGF-2 à la surface des fibroblastes et des cellules endothéliales. Sa liaison avec un de ses ligands provoque une phosphorylation de certains résidus tyrosine qui peut être mesurée à l'aide d'anticorps spécifiques. L'étude de l'activation du FGF-R1 par le facteur chimérique ou le FGF-2 naturel a été réalisée à l'aide de

fibroblastes. Ces expériences démontrent que, dans ces conditions expérimentales, le CBD-Ela-FGF-2 est moins actif que le FGF-2 commercial et que des concentrations plus élevées sont donc requises pour obtenir une activation similaire du FGF-R1 (Fig. 31).

Fig. 31: Phosphorylation du récepteur FGF-R1.

Des fibroblastes humains de derme ont été cultivés jusqu'à confluence dans du milieu DMEM contenant 10% de sérum, puis privés de sérum durant 24 h avant d'être incubés durant des temps variables (0, 10 et 40 min) avec des concentrations croissantes en FGF-2 et CBD-Ela-FGF-2. Les lysats cellulaires ont ensuite été analysés par Western blot à l'aide d'un anticorps dirigé contre le FGF-R1 phosphorylé.



Stimulation de la prolifération

Le FGF-2 utilisé comme contrôle positif induit une réponse maximale à des concentrations de l'ordre de 0.5 à 5 ng/ml, en fonction des types cellulaires, ce qui est en accord avec la littérature. Des concentrations en CBD-Ela-FGF-2 environ 10 fois supérieures sont requises pour obtenir un effet similaire (Fig. 32).

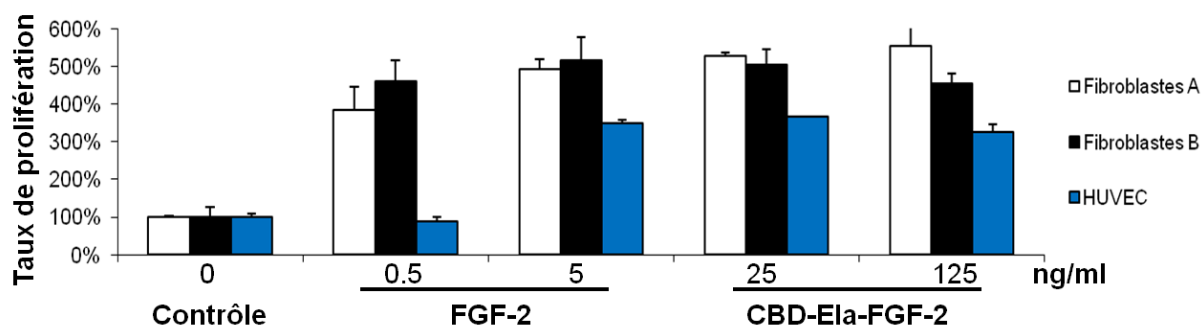


Fig. 32: Mesure du taux de prolifération de fibroblastes humains de nouveau-né (A) et d'adulte (B), et de cellules endothéliales (HUVEC) en présence et en absence de FGF-2 ou de CBD-Ela-FGF-2.

Hormis les facteurs biologiques testés, les conditions expérimentales sont les mêmes que celles détaillées dans la légende de la figure 30.

Brève conclusion

Nos résultats concernant l'activation du FGF-R1 et l'induction de la prolifération montrent que le FGF-2 chimérique est actif, mais environ 10 fois moins que le FGF-2 commercial. Ce déficit d'activité serait à mettre en rapport avec le mode de production en bactéries, qui n'est toujours pas garant d'une structure 3-D parfaite, ou avec la présence des domaines CBD et

Ela qui interféreraient avec la liaison de la molécule avec le FGF-R1. Bien que cette situation ne soit pas optimale, elle ne compromet pas le bon déroulement à long terme de l'ensemble du projet, du moins jusqu'à la phase de preuve de concept.

III.2.2.3 VEGF111 chimérique recombinante

Résistance à la dégradation

Une des propriétés remarquables du VEGF111, qui est d'ailleurs la raison principale de son utilisation dans notre modèle, est sa résistance à la dégradation par la plasmine et les protéases présentes dans l'exsudat d'ulcère. Il était donc essentiel de vérifier s'il en était de même pour la protéine chimérique CBD-Ela-VEGF111. Les VEGF111 et 165, utilisés comme témoins, et la protéine chimérique ont donc été incubés en présence de concentrations croissantes de plasmine avant d'être analysés par western blotting. Une expérience représentative (Fig. 33) montre que le VEGF165 est rapidement dégradé alors que le VEGF111 et le CBD-Ela-VEGF111 conservent leur taille initiale, confirmant ainsi leur résistance envers la plasmine.

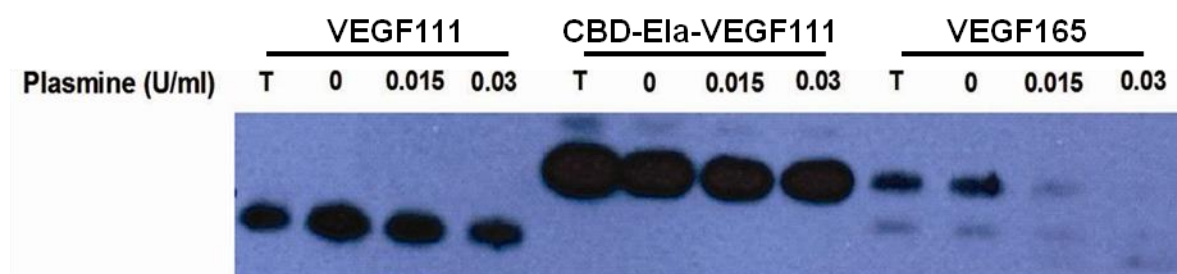


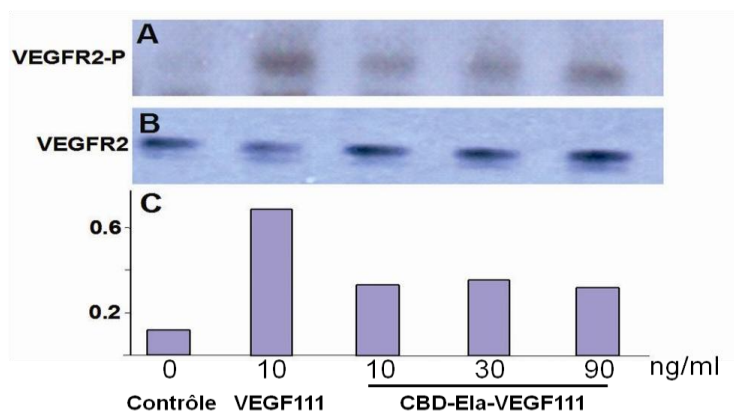
Fig. 33: Résistance du CBD-Ela-VEGF111 à un clivage par la plasmine. Une quantité fixe de VEGF111, CBD-Ela-VEGF111 ou VEGF165 a été déposée sur gel sans incubation préalable (T) ou après une incubation de 4h à 37°C avec 0, 0.015 et 0.03 U/ml de plasmine. Après migration sur gel d'électrophorèse et transfert sur membrane PVDF, les western blots ont été révélés à l'aide d'un anticorps dirigé contre le VEGF-A humain.

Activation du VEGF-R2

Nos caractérisations ont en priorité concerné la phosphorylation du VEGF-R2, le principal récepteur pour le VEGF à la surface des cellules endothéliales vasculaires. Des essais préliminaires ayant démontré que le CBD-Ela-VEGF111 était inactif lorsqu'il était produit par les bactéries utilisées pour les CBD-Ela-HB-EGF et CBD-Ela-FGF-2, nous avons eu recours à un système de bactéries *E. coli* « Origami » connu pour permettre une meilleure conformation des protéines recombinantes. Grâce à ce nouveau mode de production, un CBD-Ela-VEGF111 actif a pu être obtenu (Fig. 34). Son niveau d'activité demeure toutefois inférieur à celui du VEGF111 produit en cellules eucaryotes au sein du laboratoire et utilisé comme référence.

Fig. 34: Phosphorylation du VEGF-R2 en présence de CBD-Ela-VEGF111.

Des cellules endothéliales de porc (PAEC) exprimant à leur surface du VEGFR2 de séquence humaine ont été cultivées en absence ou en présence de VEGF111 ou de CBD-Ela-VEGF111. Une analyse par Western blotting a permis de mettre en évidence le VEGFR2 phosphorylé (A) et le VEGFR2 total (B). Une quantification des signaux obtenus en Western blotting a été réalisée et un rapport VEGFR2 phosphorylé / VEGFR2 a été calculé (C).



Stimulation de la prolifération

Des cellules endothéliales (HUVEC) ont été incubées en présence de VEGF111 et 165, utilisés comme contrôles positifs, ou de CBD-Ela-VEGF111 produit en bactérie « Origami ». Leur taux de prolifération a ensuite été comparé à celui des cultures témoins sans VEGF. Dans ce modèle, qui requiert des temps d'incubation plus long (> 48 heures) que ceux utilisés pour les mesures de phosphorylation (< 1 heure), les trois formes de VEGF ont une activité similaire (Fig. 35).

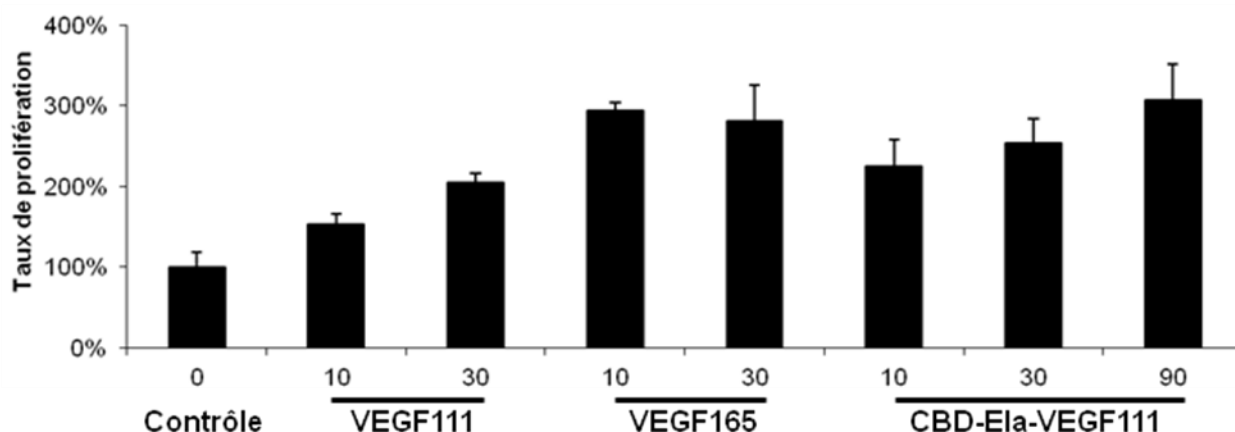


Fig. 35: Taux de prolifération des cellules endothéliales en présence de différentes concentrations de VEGF111, de VEGF165 et du facteur chimérique.

Les conditions expérimentales sont identiques à celles décrites à la figure 30. Les VEGF111 et 165 sont produits en cellules eucaryotes au sein du LCTB. Le CBD-Ela-VEGF111 est produit en bactérie « Origami » par notre partenaire (CIP).

Brève conclusion

À l'inverse des CBD-Ela-HB-EGF et CBD-Ela-FGF-2, le CBD-Ela-VEGF111 produit dans un système bactérien « classique » était dépourvu d'activité. Cette différence est sans doute liée au fait que, pour être actif, le VEGF doit être sous une forme dimérique et que sa structure finale dépend très largement de la formation adéquate de plusieurs ponts disulfures. Le recours à des bactéries « Origami » a permis de solutionner ce problème. En effet, même si l'activité du CBD-Ela-VEGF111 est inférieure à celle des témoins positifs en termes de phosphorylation du VEGF-R2, il induit la prolifération cellulaire avec la même efficacité que les isoformes natives. Ces différences d'activité entre deux modèles sont sans doute à mettre en relation avec la durée des traitements, de quelques minutes pour les phosphorylations à plus de 2 jours pour la prolifération.

III.2.2.4 Effet du VEGF111 sur la cicatrisation

Introduction

L'absence d'un procédé permettant d'associer le chitosane et les facteurs biologiques ne nous permet pas actuellement de poursuivre le développement et la caractérisation d'un pansement « bioactif ». Comme par ailleurs le VEGF111 possède des propriétés susceptibles de favoriser la cicatrisation, nous avons décidé d'établir ses modalités d'utilisation dans un modèle de plaie aiguë chez la souris et d'évaluer au cours de ces expériences préliminaires, ses effets sur la vitesse de cicatrisation et la cinétique de formation du réseau vasculaire au sein du tissu de granulation.

Résultats préliminaires

Parmi différents excipients testés, nous avons retenu un sel sodique de carboxyméthylcellulose sur base d'expériences préliminaires et de diverses contraintes ou considérations techniques. Des préparations d'excipient seul ou contenant 1 µg/ml de VEGF165 ou 111 ont été réalisées par le Laboratoire de Pharmacie Galénique (G. Piel). Des plaies de 8 mm de diamètre ont été réalisées à l'aide d'un emporte-pièce chirurgical puis traitées aux jours 0, 3 et 5 avec 100 µl d'excipient seul (n = 10), ou contenant le VEGF165 (n = 10) ou 111 (n = 10). Hormis l'application du traitement, les plaies étaient protégées par un pansement de Tegaderm puis d'Elastoplast. L'observation macroscopique montre que toutes les plaies évoluent d'une manière similaire et sont entièrement recouvertes d'un nouvel épiderme après environ 14 jours. Des animaux ont été sacrifiés aux jours 7 ou 14 après la formation de la plaie. La région correspondante à la lésion initiale ainsi que les régions

avoisinentes ont été prélevées, fixées et incluses en paraffine. Des analyses histologiques (coloration à l'hémaroxyline/éosine) (Fig. 36) et immunohistologiques (mise en évidence du CD31, un marqueur de vaisseaux sanguins) (Fig. 37) ont ensuite été réalisées.

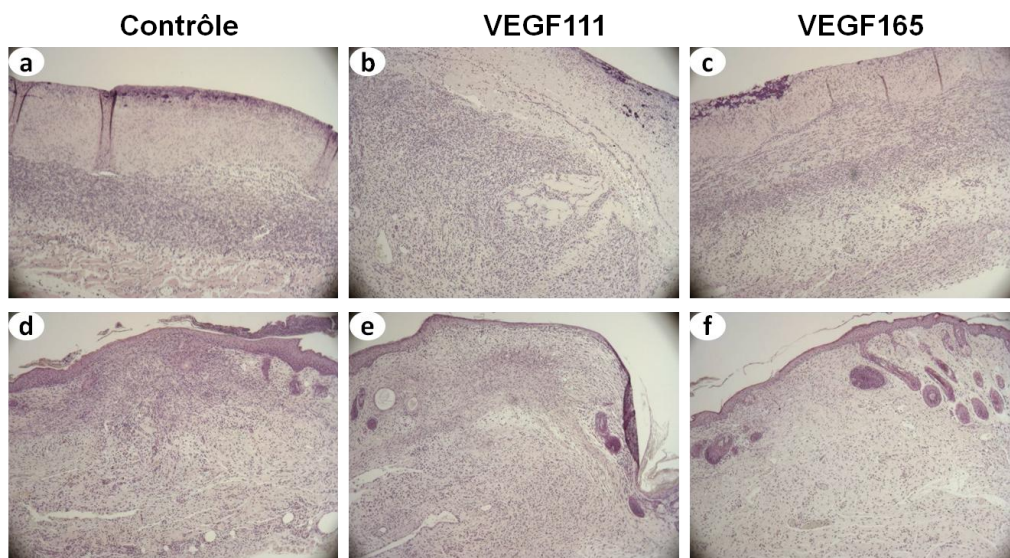


Fig. 36 : L'administration locale de VEGF111 et 165.

Des plaies cutanées de 8 mm de diamètre ont été réalisées et traitées ou non avec du VEGF165 ou 111 (100ng / application). Les animaux ont été sacrifiés aux jours 7 (a, b, c) et 14 (d, e, f). Les bordures initiales de la plaie sont localisées aux deux extrémités des photos. Le néoépiderme recouvre progressivement le tissu de granulation. Les annexes cutanées apparaissent sous formes circulaires ou allongées suivant l'angle de coupe.

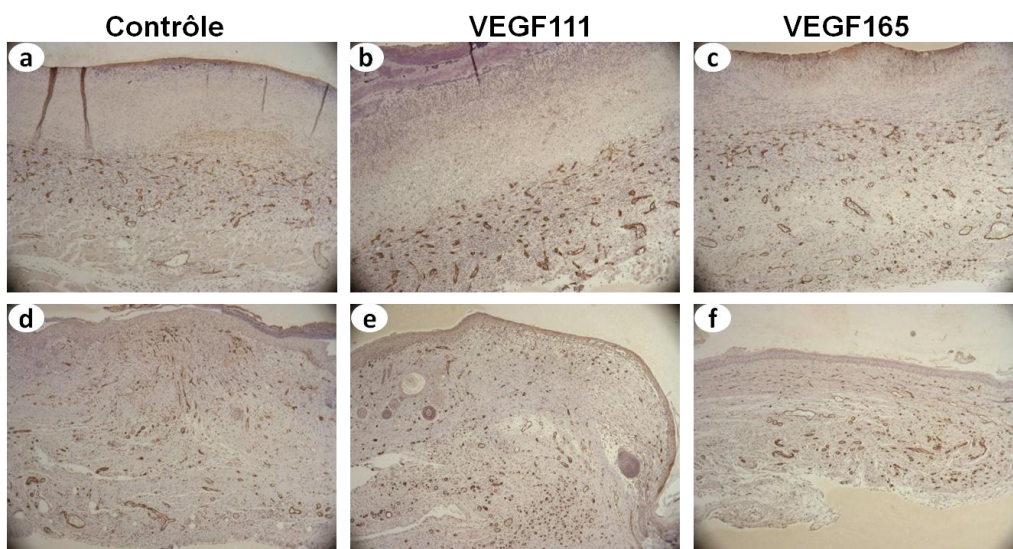


Fig. 37 : Formation des vaisseaux sanguins au niveau du site initialement lésé.

Des plaies cutanées de 8 mm de diamètre ont été réalisées et traitées ou non avec du VEGF165 ou 111. Les coupes des zones lésées ont été immunomarquées par un anticorps anti-CD31, révélées avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase et la diaminobenzidine (brun) comme substrat. Les vaisseaux sanguins sont visualisés dans le tissu de granulation après 7 (a, b, c) et 14 (a, b, c) jours de traitement.

Résultats

L'analyse de la fermeture des plaies à 7 et 14 jours (Fig. 36) ne montre aucune différence significative entre les plaies traitées à la carboxyméthylcellulose contenant ou non les deux variants de VEGF-A. Aucune différence de formation du tissu de granulation et de re-épithélialisation n'est non plus observée entre les différentes conditions expérimentales. Le marqueur endothélial CD31 met en évidence une forte néovascularisation tant dans les plaies traitées que non traitées par le VEGF. Au jour 14, toutes les plaies sont recouvertes d'un épiderme et le tissu de granulation contient de nombreux vaisseaux sanguins de façon similaire dans les plaies contrôles ou traitées par le VEGF111 ou 165.

Aucune différence manifeste n'est observée dans la cicatrisation des plaies cutanées traitées par les isoformes 165 ou 111 du VEGF confirmant que le processus fonctionne de façon optimale chez ces animaux jeunes et en bonne santé. Il sera sans doute nécessaire d'utiliser, comme de nombreux autres auteurs [159, 181], un modèle animal de cicatrisation retardée tel celui utilisant les souris diabétiques db/db.

I. DISCUSSION

IV. DISCUSSION

Les plaies cutanées chroniques surviennent lorsqu'une étape du processus normal de cicatrisation est altérée ou significativement retardée [109]. La prévalence des plaies chroniques est estimée à 1% de la population des pays développés [114, 116] avec un coût annuel des soins estimé à plus de 3 milliards de dollars aux Etats-Unis [117] et bien plus encore en Europe [118]. Ces chiffres devraient encore progresser en raison du vieillissement général de la population et de l'accroissement de l'incidence du diabète et de l'obésité, trois conditions physiopathologiques connues pour influencer sur différents aspects de la cicatrisation. En plus des considérations purement médicales, les ulcères et les complications qui en résultent affectent également considérablement la qualité de vie des patients au niveaux social, économique et psychologique [119]. Les pansements les plus couramment utilisés de nos jours ont pour buts principaux de protéger la plaie contre les infections et de réguler le niveau d'humidité de la zone ulcérée, en absorbant l'exsudat en excès pour éviter la macération (ulcère veineux, par exemple) ou, dans le cas des ulcères « secs » de type artériel, en maintenant un taux d'humidité approprié pour un débridement efficace des tissus nécrosés [108]. Ils nécessitent un remplacement régulier mais présentent par ailleurs certains avantages pratiques tels leur faible coût ainsi que leur facilité de manipulation et de stockage. En dépit de leur utilisation courante, ce type de pansement est loin de donner entière satisfaction.

Des progrès considérables ont été faits dans le domaine de la compréhension des processus cellulaires et moléculaires impliqués dans la cicatrisation des plaies aiguës, la pathobiologie des plaies chroniques et la régénération tissulaire. Ces connaissances nouvelles ont conduit à de nombreuses hypothèses et au développement d'approches thérapeutiques innovantes visant à accélérer la fermeture des plaies chroniques et à produire des cicatrices plus fonctionnelles et esthétiques [98]. On peut citer, par exemple, les pansements contenant des macromolécules présentes dans la MEC (collagène/gélatine, acide hyaluronique) ou d'autres types de polymères naturels ou synthétiques [124, 125, 127, 128]. Des substituts cutanés, qu'ils soient d'origine naturelle (peau ou paroi intestinale décellularisées) ou obtenus par ingénierie tissulaire sont également utilisés ou évalués. L'utilisation d'inhibiteurs de MMPs, de cellules souches ou le recours à la thérapie génique (transfection de plasmides permettant l'expression de VEGF, par exemple) [98, 110, 114, 125] sont également rapportés. Les facteurs de croissance comptent également parmi les molécules les plus étudiées. En dépit de résultats prometteurs observés dans divers modèles animaux, seul le PDGF-BB a montré une efficacité clinique chez l'Homme [88] et est approuvé pour le traitement des ulcères par la « U.S. Food

and Drug Administration » [91, 100, 109, 128]. Il est commercialisé sous l'appellation de Regranex® ou Bécaplermine [182].

En dépit d'une activité intense de recherche dans ce domaine, l'utilisation de ces nouveaux moyens thérapeutiques reste cependant relativement limitée, et ce pour diverses raisons [98, 115, 126] dont certaines sont énoncées ci-dessous :

- Leur efficacité n'est pas toujours démontrée de manière irréfutable.
- Les champs d'application des diverses stratégies thérapeutiques ne sont pas toujours bien définis, alors que l'étiologie des plaies chroniques peut être très diverse.
- Les molécules solubles, dont les facteurs de croissance, sont éventuellement emportées par l'exsudat ou dégradées par les protéases qui y sont présentes en abondance.
- Les pansements contenant des macromolécules d'origine animale ou humaine peuvent transmettre des agents infectieux, tels les prions ou divers virus. Des questions se posent également quant à la traçabilité de leurs composants et à la reproductibilité de leurs propriétés qui risquent de varier en fonction des lots de production.
- Les équivalents de peau produits *in vitro* et contenant des cellules vivantes peuvent également être porteurs d'agents infectieux. Ils sont par ailleurs fragiles, très onéreux et ne peuvent être facilement fabriqués à grande échelle alors qu'ils sont difficiles à stocker et à transporter, ce qui limite grandement leur champ d'application. On peut également signaler des problèmes liés au rejet immunitaire lorsqu'il s'agit d'allogreffes. Des greffes contenant des cellules du patient (autogreffes) seraient ainsi plus indiquées, mais elles soulèvent d'autres problèmes liés, par exemple, aux coûts encore plus élevés engendrés par la difficulté à "industrialiser" la production, ou au fait de créer une plaie pour prélever des tissus sains chez des patients cicatrisant avec difficulté.

Il est donc clair que, en dépit d'une meilleure connaissance à la fois des mécanismes impliqués dans la cicatrisation et des altérations qui conduisent à la formation de plaies chroniques, aucune approche thérapeutique satisfaisante n'est à l'heure actuelle mise à disposition du corps médical et des patients. C'est dans ce contexte que notre projet avait été initié. Il visait à développer et caractériser un pansement sur base des connaissances les plus récentes concernant les biomatériaux et la biologie cellulaire, plus particulièrement dans le domaine des interactions s'établissant entre les cellules et leur environnement matriciel. Le prototype à développer devait répondre à différentes exigences préalables. Aucune cellule ou molécule d'origine humaine ou animale ne devait entrer dans sa composition et la traçabilité

de ses différents composants devait être parfaite. Il devait par ailleurs être peu onéreux ainsi qu'aisé à produire et à distribuer afin de favoriser son emploi à grande échelle. Enfin, il avait été décidé d'y adjoindre des facteurs biologiques qui permettraient de stimuler la cicatrisation, en vérifiant toutefois qu'ils puissent être produits selon les standards les plus stricts de l'industrie pharmaceutique, concernant notamment la production de protéines recombinantes en système procaryote.

Ces prérequis nous ont amenés à conceptualiser un pansement qui serait réalisé à base de chitosane nanofibrillaire et qui pourrait être, dans un second temps, « bioactivé » par ajout de facteurs biologiques pertinents. Notre tâche au sein de ce projet consistait à caractériser les propriétés biologiques des divers composants destinés à la création de ce futur prototype de pansement et à valider la pertinence de nos approches technologiques. Ces démonstrations avaient été initialement envisagées en trois étapes, dont seules les deux premières ont pu être réalisées au cours de ce travail :

1. Evaluation de la biocompatibilité *in vitro* et *in vivo* du biomatériau, suivi de son utilisation comme pansement dans des modèles expérimentaux chez la souris.
2. Détermination de l'activité biologique des protéines chimériques recombinantes devant servir pour la bioactivation.
3. Effet du pansement bioactivé au cours du processus de cicatrisation normale ou retardée dans des modèles expérimentaux développés chez l'animal.

IV.1 EVALUATION DES PROPRIETES BIOLOGIQUES DU CHITOSANE

Le chitosane est une forme de chitine partiellement déacétylée. Les raisons de son choix pour la réalisation de notre futur pansement étaient liées à de nombreuses publications suggérant ou démontrant sa biocompatibilité élevée, son caractère biodégradable, son absence d'antigénicité et sa structure rappelant celle de glycosaminoglycanes présents dans la MEC [136]. Aucune réaction inflammatoire aiguë ou allergique n'a été observée chez l'homme, que ce soit après application locale, implantation, injection et même ingestion [183]. Le chitosane est par ailleurs largement utilisé comme dispositif médical sous forme de granule (CELOX®), de film, d'éponge hémostatique (Hemcon®), de bande (TraumaStat®) et de matériau non tissé (chitopack C®) [146]. Ceci démontre bien que son utilisation pour des applications cutanées est bien acceptée dans le monde médical et n'engendre aucun effet néfaste, même lorsqu'il est en contact direct avec une plaie aiguë. Toujours dans l'optique de nous placer d'emblée dans des conditions optimales pour favoriser l'usage à grande échelle de ce pansement, s'il démontrait son efficacité, nous avons posé le choix d'utiliser du chitosane

produit à partir de cultures de champignons spécialement dédiées à ce type de production et réalisées de manière bien contrôlée. En effet, cette source d'approvisionnement de matière première facilite la production de lots de qualité constante, en particulier en comparaison à du chitosane obtenu à partir des déchets de l'industrie de la pêche (carapaces de crabes et de crevettes, os de seiche, ...), qui présente par ailleurs le risque d'induire des réactions allergiques chez les personnes sensibles aux crustacés [184].

Après la nature du biomatériau de base, le deuxième choix posé a concerné sa mise en œuvre sous forme de nanofibres, afin, notamment, de mimer la structure tridimensionnelle des fibres présentes au sein du derme. Parmi les techniques utilisées pour la production de nanofibres, l'électrofilage s'est imposé comme un procédé de choix. Il est relativement simple, peu coûteux et rapide pour la production des fibres ultrafines continues, alignées ou non, et ayant un diamètre variant du micro- au nanomètre [185]. Il offre également la possibilité de procéder à diverses modifications de la nanofibre au cours de sa production [186]. Enfin, le tapis de nanofibres de chitosane possède un rapport élevé entre la surface accessible et son volume, une grande porosité interfibrillaire et une souplesse suffisante permettant de s'adapter à la géométrie des plaies et aux sollicitations mécaniques auxquelles elles sont soumises [151, 187].

Caractérisations *in vitro* des propriétés spécifiques du chitosane nanofibrillaire

Les analyses *in vitro* ont porté sur la comparaison des propriétés, en culture cellulaire, du chitosane sous forme d'un tapis nanofibrillaire ou d'un film obtenu par évaporation, utilisé à des fins de contrôle. Ces deux types de support de culture ont été fabriqués à partir du même lot de chitosane, puis neutralisés, stérilisés et lavés d'une manière identique afin de prévenir toute différence autre que d'ordre architectural. Leur biocompatibilité respective a été déterminée à l'aide de fibroblastes, de cellules endothéliales et de kératinocytes, les trois types de cellules « non-inflammatoires » les plus directement impliquées dans la cicatrisation. Bien que les kératinocytes aient été étudiés dans un laboratoire partenaire (LabCeTi, FUNDP), les résultats les concernant sont également discutés dans ce travail par souci de fournir une vue d'ensemble des propriétés *in vitro* du chitosane.

Des études antérieures, hautement critiquables au point de vue des analyses réalisées dans le domaine de la biologie cellulaire, rapportaient un attachement efficace de cellules sur des films de chitosane [175, 188]. Nos résultats, en accord avec d'autres études [189, 190], démontrent à l'inverse un attachement très limité et une absence d'étalement des fibroblastes et des cellules endothéliales, ce qui se traduit notamment par la formation d'agrégats

cellulaires, une prolifération réduite et une mort par apoptose aux temps de culture les plus longs. Les kératinocytes sont moins affectés, même si diverses caractérisations indiquent que ce type de substrat est loin d'être idéal. A l'inverse, le chitosane sous forme de nanofibres est propice à l'attachement, l'étalement et la prolifération des trois types cellulaires étudiés, ainsi qu'aux étapes initiales de la différenciation des kératinocytes. La différence d'activité biologique observée entre le film et les nanofibres de chitosane, alors qu'ils sont pourtant d'une composition chimique identique, démontre clairement l'importance de l'architecture du substrat mais ne révèle en rien les mécanismes sous-jacents. De nombreuses études s'intéressant à d'autres modèles expérimentaux rapportent des effets similaires en termes de morphologie, modification du cytosquelette et même de différenciation [191-194]. Plusieurs facteurs peuvent justifier ces effets liés à l'architecture des substrats. Les différences de rigidité entre un film fixé sur le plastique et des nanofibres relativement mobiles ne peuvent probablement pas être invoquées, puisqu'il est admis qu'une rigidité accrue stimule au contraire l'attachement et la prolifération cellulaire. D'autres hypothèses concernent la surface spécifique bien supérieure dans le cas des nanofibres, ce qui accroît d'autant les possibilités d'adhésion cellulaire, ou encore le fait que la topographie nanofibrillaire induise des modifications de la distribution des adhésions focales et des intégrines et donc de la structure du cytosquelette. La vérification de ces hypothèses n'a pas été entreprise durant ce travail au cours duquel nous avons préféré nous focaliser sur les propriétés du biomatériau *in vivo* dans des modèles plus pertinents pour l'évaluation des propriétés de notre prototype de pansement. Deux conditions ont fait l'objet de caractérisations plus poussées : l'implantation sous-cutanée du biomatériau et son utilisation pour la couverture de plaie de seconde intention chez la souris.

Implants sous-cutanés

Cette approche expérimentale permet de laisser le biomatériau en place durant plusieurs mois, ce qui donne la possibilité d'analyser des processus biologiques s'établissant de manière lente et progressive. Pour ces caractérisations, les films de chitosane n'ont pas été utilisés en raison de leur structure en 2D qui empêche toute colonisation ou migration. Nous leur avons préféré, comme contrôles, des mousses obtenues par lyophilisation. Elles se présentent en effet sous la forme d'une structure en 3D, comme les nanofibres, mais avec une topographie fine complètement différente sous forme de travées et de feuillets épais ($> 1 \mu\text{m}$) bordant des pores de grandes tailles. Chez les souris implantées, aucune réaction inflammatoire significative n'a été observée au niveau de l'incision suturée ou du site d'implantation. De

même, aucune production d'anticorps anti-chitosane n'a pu être mise en évidence, quelque soit le type de matériau ou le temps évalué (1 à 3 mois). Les souris ont été sacrifiées à des temps variant de 1 à 12 semaines afin de récupérer les implants et de les analyser. L'aspect macroscopique, rouge pour les éponges et d'une couleur pâle similaire à celle de la face interne du derme pour les nanofibres, était déjà évocateur de différences très nettes de biocompatibilité. Les implants ont ensuite été analysés, notamment par immunohistochimie et microscopie électronique (LabCeTi). L'analyse des éponges ne révèle aucune colonisation par des cellules endothéliales ou des fibroblastes, seules quelques cellules leucocytaires étant présentes dans les couches les plus superficielles du matériau. Une caractéristique remarquable est la présence d'une capsule conjonctive entourant l'implant. Cette structure particulière est riche en collagène et contient de nombreux fibroblastes et des vaisseaux sanguins. On y distingue également des cellules inflammatoires, dont de nombreuses cellules géantes multinuclées. Celles-ci sont caractéristiques d'un granulome à corps étranger qui peut être considéré comme un mécanisme permettant à l'organisme d'isoler un élément étranger trop volumineux ou trop résistant pour être éliminé. Sur ces bases, on peut donc considérer que, même s'il n'induit pas la formation d'anticorps ou ne cause pas une réaction inflammatoire massive, le chitosane n'est pas biocompatible lorsqu'il est sous forme de feuillets et de travées de structure micrométrique, ce qui n'est pas sans rappeler nos résultats *in vitro* concernant les films obtenus par évaporation.

En ce qui concerne le matériau formé de nanofibres de chitosane aucune capsule conjonctive n'a jamais été observée, à aucun des temps testés. A l'inverse, une colonisation progressive est observée au cours du temps. Elle est principalement le fait de fibroblastes et de cellules endothéliales formant des vaisseaux sanguins. Quelques cellules leucocytaires sont également notées, plus particulièrement aux temps les plus courts. De manière remarquable, l'orientation générale des cellules fibroblastiques et des dépôts de collagène néosynthétisé est largement dictée par la manière dont sont organisées les nanofibres de chitosane. Afin de mieux caractériser à la fois les mécanismes de migration au sein de la matrice nanofibrillaire et les interactions s'établissant entre le matériau d'une part et les cellules ou la MEC néosynthétisée d'autre part, des observations par microscopie électronique ont été réalisées. Elles confirment nos hypothèses basées sur les images d'immunohistochimie. On distingue en effet des cellules fibroblastiques comprimées en divers endroits par l'enchevêtrement des nanofibres. Le noyau cellulaire lui-même est comprimé et « étranglé » par endroits, ce qui est en accord avec des images de cellules en cours de migration. En plus de cette déformation cellulaire, il est vraisemblable que la nature de l'implant, constitué de nanofibres non tissées, facilite le

processus migratoire puisque les fibres individuelles ne sont pas fixées et devraient donc pouvoir légèrement s'écarter ou glisser les unes par rapport aux autres. Les fibrilles de collagène nouvellement déposées par les fibroblastes et qui, à terme, serviront de base structurelles à la formation de la nouvelle MEC sont, comme les fibroblastes, trouvées en contact étroit avec les nanofibres de chitosane. Plus qu'une simple observation, ces résultats suggèrent que de tels biomatériaux sont capables de dicter l'architecture du tissu en cours de réparation et d'influencer ainsi ses futures propriétés. Des applications en ingénierie tissulaire pour la médecine régénérative sont ainsi envisageables à condition de pouvoir produire un réseau de nanofibres électrofilées possédant une structure similaire à celle du tissu à réparer : « ondulantes » pour mimer la MEC du derme, parallèles et alignées longitudinalement comme les faisceaux de collagène dans un tendon ou formant un manchon comme les lamelles fibro-élastiques des vaisseaux de gros calibre. Comme par ailleurs le réseau de nanofibres est progressivement envahi par des vaisseaux sanguins, le nouveau tissu en formation devrait être viable à long terme et subir un remaniement progressif en fonction de son environnement local. Dans ce contexte, l'étude du devenir du biomatériau au cours du temps est un point essentiel. Le contour irrégulier des nanofibres après des temps d'implantation de trois mois suggérerait un début de dégradation, même s'il n'est pas exclu que cette apparence résulte d'un recouvrement progressif des nanofibres par des molécules de la MEC. D'autres images montrent des granules denses à l'intérieur de certaines cellules, et cela uniquement aux temps les plus longs. Il pourrait s'agir de chitosane phagocyté en cours de dégradation, même si aucune preuve n'a pu en être apportée. Des études supplémentaires dont le but serait de caractériser le diamètre des fibres ou de doser le chitosane résiduel en fonction du temps d'implantation seraient nécessaires pour répondre à cette question. Il est toutefois indiscutable que le chitosane, même sous forme de nanofibres, ne se dégrade que très lentement, ainsi que le suggéraient des études antérieures évaluant diverses formes ou divers dérivés de chitosane [195].

Les matrices de chitosane utilisées dans cette étude ont toutes été préparées à partir d'un même lot de chitosane caractérisé par un poids moléculaire moyen et un degré d'acétylation spécifique. Il serait également intéressant d'évaluer d'autres lots de chitosane ayant des propriétés physicochimiques différentes, et en particulier un degré d'acétylation plus élevé, puisque la chitine, qui est formée uniquement de monomères de N-acétyl-glucosamine, est sensible aux chitotriosidases et au lysozyme [196-198].

Pansements à base de nanofibres

Sur la base de ces résultats démontrant la biocompatibilité élevée du chitosane nanofibrillaire, un modèle de plaie avec perte de substance a été également évalué dans chez la souris. Appliquées directement sur la plaie, les nanofibres de chitosane y adhèrent parfaitement. Par rapport aux contrôles, une stimulation de la cicatrisation a été observée dès le 7^{ième} jour et était toujours bien marquée après trois semaines. Les effets se manifestent par un recrutement précoce mais non excessif de cellules inflammatoires, l'organisation rapide d'un tissu de granulation structuré contenant de nombreux vaisseaux sanguins et la formation accélérée d'une nouvelle couverture épidermique et des annexes cutanées. Le nombre de myofibroblastes au sein du tissu en réparation baisse également plus rapidement dans le groupe des souris traitées par les nanofibres de chitosane, un processus qui caractérise la phase terminale de la cicatrisation [199] et suggère une réduction du risque de formation d'une cicatrice excessive [83].

Les mécanismes spécifiques impliqués dans l'effet bénéfique des nanofibres sur la cicatrisation cutanée restent à identifier, mais sont probablement influencés par la nature chimique et la structure nanofibrillaire du chitosane. Comme nous l'avons précédemment mentionné, la topographie nanométrique peut modifier l'organisation du cytosquelette et le phénotype des cellules, probablement en affectant le mode d'adhésion cellulaire [200, 201]. Il a été récemment montré, en utilisant l'acide poly-L-lactique (PLLA) ou la polycaprolactone (PCL), que la structure et l'organisation des fibres régulaient l'activation des macrophages *in vitro* [193] et la réponse immunitaire *in vivo* [191]. Par rapport aux autres matériaux, la structure nanofibrillaire présente une surface spécifique très élevée qui pourrait favoriser le piégeage de facteurs préjudiciables au processus de réparation lorsqu'ils sont présents en excès (protéases, radicaux libres, etc) et accroître comme évoqué précédemment la surface disponible pour l'adhésion et la migration cellulaire durant les premiers jours du processus. Une autre hypothèse, également liée à la surface spécifique élevée des nanofibres, impliquerait une dégradation du chitosane par les cellules inflammatoires ou les diverses protéases impliquées dans les cascades de coagulation par exemple. Sur base de nos résultats concernant les implants sous-cutanés, cette dégradation potentielle devrait être limitée mais pourrait être suffisante pour induire la production de petits fragments de chitosane et/ou de monomères de glucosamine ou de N-acétyl glucosamine qui sont connus pour stimuler la migration et l'activation des neutrophiles et macrophages [202-204]. A leur tour, ces cellules participeraient à une augmentation locale de nombreux facteurs biologiques (facteurs de croissance, cytokines, protéases) impliqués dans la régulation du processus inflammatoire et

de la cicatrisation dans son ensemble. Les neutrophiles et macrophages produisent par ailleurs de la chitotriosidase et du lysozyme qui, chez l'homme, comptent parmi les rares enzymes capables de dégrader la chitine [197, 198, 205], permettant aussi de renforcer leur recrutement par une libération lente et continue de fragment de chitosane. Bien que ces enzymes soient décrites comme agissant sur la chitine, la présence d'une certaine proportion résiduelle de N-acétyl-glucosamine dans le chitosane pourrait constituer des séquences de clivage. L'existence d'un récepteur spécifique pour le résidu N-acétyl-glucosamine à la surface des macrophages a été rapportée [202, 206]. La liaison des macrophages à la surface du biomatériau induit leur activation qui est à l'origine de nombreux processus inflammatoires participant à la cicatrisation : production de cytokines et de NO, phagocytose et éventuellement présentation d'antigènes aux lymphocytes, chémoattraction et activation d'autres types cellulaires dont les fibroblastes [202].

Dans l'optique d'une utilisation ultérieure des nanofibres de chitosane pour les soins des plaies chroniques, les expériences décrites ci-dessus devraient idéalement être répétées dans des modèles de plaies chroniques chez des animaux ayant une structure cutanée similaire à celle de l'homme. A l'heure actuelle, un tel modèle combinant retard de cicatrisation et similarité de peau avec celle de l'homme n'existe pas. Nous envisageons donc d'utiliser dans le futur deux modèles animaux. Le plus aisé à étudier est le modèle des souris diabétiques (db/db) qui sont bien connues et caractérisées en ce qui concerne les retards de cicatrisation cutanée [207]. Le second modèle est celui du porc qui, de tous les animaux utilisés en laboratoire, est celui dont la peau est structurellement et fonctionnellement la plus proche de celle de l'homme [208, 209]. Notre but est donc, à l'aide de ces deux modèles complémentaires, de mieux cerner le potentiel thérapeutique des nanofibres de chitosane dans le cadre des plaies cutanées chez l'homme. Une approche complémentaire est de tenter d'améliorer et/ou renforcer les propriétés biologiques des nanofibres de chitosane afin de favoriser non seulement leur utilisation pour le traitement des plaies chroniques mais aussi comme dispositif médical ou matrice de support en ingénierie tissulaire. Plusieurs types d'évolution sont ainsi envisageables :

- le développement d'une matrice plus épaisse par superposition de plusieurs tapis de nanofibres ou par prolongement du temps d'électrofilage afin d'améliorer le pouvoir absorbant du pansement ;
- la reconversion partielle du chitosane en chitine, ce qui permettrait de moduler la vitesse de dégradation des nanofibres ;

- un changement des paramètres d'électrofilage afin d'obtenir des nanofibres dont l'orientation générale est adaptée à leur utilisation future (ondulantes pour le derme ou uniaxiales et parallèles pour le tendon par exemple);
- la compartimentalisation de la matrice pour développer un support propice aux kératinocytes en surface du biomatériau et aux fibroblastes et cellules endothéliales en profondeur ;
- le co-électrofilage du chitosane avec des macromolécules biologiques tels le collagène, l'acide hyaluronique et l'alginate ;
- le couplage des motifs d'adhésion cellulaire (« bioactivation »), ce qui permettrait d'améliorer l'attachement, la migration, la prolifération et la différenciation de cellules [174]. Cette dernière approche a déjà été partiellement évaluée au cours de ce travail.

IV.2 BIOACTIVATION

L'administration de différents facteurs d'origine exogène à la surface de plaies chroniques est un moyen thérapeutique théoriquement simple et potentiellement efficace. Il est toutefois difficile de maintenir une concentration locale optimale en facteurs biologiques, notamment en raison de leur sensibilité à la dégradation par des protéases, dont les concentrations sont anormalement élevées dans les plaies chroniques, mais aussi parce que la production d'exsudat, fréquente dans les ulcères, emporte ces facteurs à distance de la plaie. Pour pallier cette difficulté, une solution consisterait à procéder à des injections locales. Cette approche présente toutefois de nombreux inconvénients dont, notamment, la formation de gradients de concentration inhomogènes qui ne permettent pas un contrôle optimale des doses les plus efficaces [210, 211]. Par ailleurs, le facteur est injecté dans le tissu alors qu'une part importante des processus de cicatrisation a lieu en surface ou à sa proximité immédiate. Des effets systémiques néfastes pourraient également être à craindre en cas de diffusion importante dans le sang. Une immobilisation à la surface d'un biomatériau utilisé comme pansement est une alternative séduisante. Moyennant quelques améliorations et mises au point, une telle approche pourrait permettre :

- de maintenir une concentration locale plus constante et plus homogène ;
- de protéger, au moins partiellement, les facteurs biologiques contre la dégradation par les protéases locales.
- l'arrêt immédiat du traitement, par simple retrait du pansement, en cas de réaction néfaste.

- de faciliter les soins en milieux non hospitaliers et de réduire les coûts en cas de production à une échelle suffisante.

La méthodologie pour immobiliser les facteurs biologiques sur le biomatériau devait répondre à différents critères :

- Permettre de préserver l'activité biologique des facteurs immobilisés ;
- Être réalisable de manière aussi systématique et modulable que possible, afin de faciliter les processus de développement et de caractérisation ;
- Permettre l'immobilisation pendant ou après le processus d'électrofilage.

La stratégie finalement privilégiée a été de produire les facteurs biologiques sous forme de protéines chimériques formées de la séquence responsable de l'activité biologique à l'extrémité C-terminale, d'un domaine N-terminal possédant une affinité élevée pour le chitosane et, éventuellement, d'une séquence dérivée de l'élastine humaine qui serait placée en position centrale afin de séparer physiquement les deux autres domaines et d'éviter qu'ils n'interfèrent l'un avec l'autre. Une telle approche devrait donc permettre d'uniformiser le mode de présentation des protéines d'intérêt tout en garantissant le maintien de leurs fonctions biologiques. Une stratégie similaire a été utilisée dans d'autres études pour favoriser l'immobilisation de protéines, notamment du VEGF, au sein d'une matrice de collagène [211, 212].

Deux types de motifs permettant potentiellement une adhésion au chitosane ont été testés alternativement. Le premier (CBD) dérive d'une chitinase procaryote alors que le second (Pept 11) a été identifié par criblage d'une librairie aléatoire de phages. Toutes les protéines chimériques contenant comme facteur biologique le HB-EGF, le VEGF111, le FGF-2 ou un multimère de « GRGDS » ont pu être produites et purifiées avec d'excellents rendements. Toutes ont également montré des niveaux d'activité biologique satisfaisants. Ces observations montrent que le motif d'adhésion au chitosane et la séquence centrale dérivée de l'élastine n'engendrent pas d'encombrement stérique et permettent l'interaction des différents médiateurs biologiques avec leurs récepteurs respectifs. Ces résultats confirment des études antérieures démontrant que le couplage du VEGF-165 [210, 213] ou de l'EGF [212] à un motif peptidique d'adhésion au collagène n'affectait pas leurs activités respectives. De manière similaire, la séquence "GRGDS" a été utilisée avec succès en fusion avec un motif d'adhésion à la cellulose pour améliorer l'adhésion cellulaire [214].

Les essais visant à évaluer l'affinité des motifs CBD et Pept11 ont démontré un niveau d'affinité pour le chitosane trop faible pour permettre l'immobilisation efficace des protéines chimériques à la surface des nanofibres. En dépit de cet échec relatif, la conservation de

l'activité des facteurs biologiques produits sous forme chimérique démontre que notre stratégie initiale était pertinente et demeure prometteuse à condition d'identifier un moyen d'immobilisation efficace à la surface des nanofibres de chitosane. Certaines des pistes qui pourraient être explorées sont brièvement mentionnées ci-dessous.

- **Amélioration des séquences peptiques identifiées.**

La plupart des séquences identifiées par criblage de la librairie de phages présentent de larges similitudes, dont, notamment un caractère fortement basique. Sur ces bases, nous tenterons d'améliorer l'affinité de tels peptides pour le chitosane, en vérifiant par ailleurs que ces séquences ne soient pas immunogènes ou ne soient pas trop rapidement clivées par la plasmine ou d'autres protéases, ce qui limiterait bien sûr leur emploi en tant que motif d'immobilisation.

- **Développement de nouvelles séquences d'adhésion.**

Certaines lectines ont une affinité pour les résidus glucosamine ou N-acétyl-glucosamine et pourraient donc être utilisées, sous forme de molécule entière ou de séquences partielles. Il faudrait toutefois vérifier qu'elles n'engendrent pas un encombrement stérique excessif et n'entraîne pas une réaction immunitaire puisqu'elles ne sont pas d'origine humaine. Une alternative serait d'utiliser des séquences dérivées des mucines. Cette famille de protéines est caractérisée par la présence de séquences répétitives de type Pro/Thr/Ser permettant une très forte glycosylation qui serait responsable des interactions observées dans le poumon entre le chitosane et le mucus tapissant l'épithélium pulmonaire [215, 216]. Cependant, le domaine dérivé de la mucine devant être glycosylé pour remplir sa fonction de fixation au chitosane, la production de la protéine chimérique dans un système procaryote ne pourrait être envisagé.

- **Fonctionnalisation des nanofibres.**

Bien qu'une fixation des protéines chimériques au chitosane par des agents pontants soit réalisable, cette approche ne nous semble pas judicieuse car elle ne garantit pas l'orientation de la protéine immobilisée ni la conservation de son activité. Une alternative serait d'immobiliser un partenaire d'interaction qui servirait d'intermédiaire à la fixation de nos protéines chimériques actuelles ou à de nouvelles qui seraient développées. Cette approche nécessiterait toutefois de vérifier de nombreux paramètres concernant notamment la biocompatibilité des nanofibres modifiées.

Une autre solution, mais qui présenterait également des inconvénients, serait de reconvertir les nanofibres de chitosane en chitine après électrofilage afin de pouvoir tirer parti des domaines de liaison possédant une affinité élevée pour la chitine, comme le CBD par exemple.

- **Composition des nanofibres.**

D'autres solutions aux divers problèmes évoqués ci-dessus existent, mais ne font plus directement appel à la technologie des protéines chimériques. On pourrait par exemple envisager l'électrofilage de chitosane contenant une quantité limitée de chitosane modifié, tel le triméthylchitosane qui demeure chargé positivement à pH neutre et devrait favoriser ainsi de nombreux types d'interactions. Enfin, il est techniquement réalisable de produire des nanofibres de chitosane creuses servant de réservoir pour des facteurs de croissance ou encore d'ajouter aux pansements des nanocapsules biodégradables contenant les protéines chimériques. Si ces diverses propositions de modifications nous éloignent du projet original, elles démontrent que le concept de base est valable et se prête à des modulations novatrices.

I. CONCLUSION

V. CONCLUSION

Le but principal de l'ensemble du projet était de réaliser un prototype de pansement constitué de nanofibres de chitosane et dont les propriétés pourraient être améliorées, dans un second temps, par utilisation de facteurs biologiques immobilisés à la surface des nanofibres.

La première tâche de notre laboratoire a été de caractériser *in vitro*, dans des cultures de fibroblastes et de cellules endothéliales, les propriétés des matériaux et des facteurs biologiques développés et produits par nos partenaires. Les résultats remarquables obtenus avec le chitosane électrofilé nous ont ensuite incités à évaluer ses propriétés *in vivo* dans deux modèles complémentaires. Lorsqu'il est implanté sous la peau pour étudier son devenir à long terme, le matériau composé de nanofibres de chitosane n'induit aucune forme de rejet ou de réponse immunitaire mais est, au contraire, progressivement intégré dans le tissu environnant. Par ailleurs, nos analyses démontrent clairement que la structure des nanofibres et leur architecture sont capables d'influencer de façon significative la manière dont les cellules migrent au sein du matériau et y déposent une nouvelle matrice extracellulaire, ce qui ouvre des perspectives prometteuses d'utilisation en ingénierie tissulaire. Lorsque les nanofibres sont appliquées directement sur une plaie cutanée, le processus de cicatrisation est accéléré. Il semble que ces effets bénéfiques résultent d'événements relativement précoces survenant durant la phase inflammatoire. Leur nature n'est pas encore connue mais mériterait une étude spécifique approfondie.

Les caractérisations des protéines hybrides destinées à améliorer les propriétés du pansement formé de nanofibres ont également été réalisées. Nous avons pu démontrer que les facteurs de croissance ou les motifs d'adhésion conservent une activité biologique spécifique suffisante pour les étapes ultérieures du projet lorsqu'ils sont produits sous forme de protéines chimériques contenant un domaine destiné à se lier au nanofibres. Cette première preuve de concept était une étape importante même si l'évaluation de la validité de notre hypothèse initiale nécessitera l'identification de séquences possédant une affinité suffisante pour le chitosane. Les propriétés intrinsèques remarquables du pansement nanofibrillaire ouvrent des perspectives d'utilisation thérapeutique pour le soin des plaies cutanées qui devront être évaluée au cours d'essais cliniques chez l'Homme.

I. BIBLIOGRAPHIE

VI. BIBLIOGRAPHIE

- [1] Spellberg B. The cutaneous citadel: a holistic view of skin and immunity. *Life Sci.* 2000;67:477-502.
- [2] Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol.* 2002;12:390-9; quiz 400-1.
- [3] Wysocki AB. Skin anatomy, physiology, and pathophysiology. *Nurs Clin North Am.* 1999;34:777-97, v.
- [4] Prost-Squarcioni C, Fraitag S, Heller M, Boehm N. [Functional histology of dermis]. *Ann Dermatol Venereol.* 2008;135:1S5-20.
- [5] Prost-Squarcioni C. Histology of skin and hair follicle. *M S-Med Sci.* 2006;22:131-7.
- [6] Burgeson RE, Christiano AM. The dermal-epidermal junction. *Curr Opin Cell Biol.* 1997;9:651-8.
- [7] Madison KC. Barrier function of the skin: "la raison d'être" of the epidermis. *J Invest Dermatol.* 2003;121:231-41.
- [8] Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol.* 2008;17:1063-72.
- [9] Bouwstra JA, Ponc M. The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* 2006;1758:2080-95.
- [10] DeBenedictis C, Joubert S, Zhang G, Barria M, Ghohestani RF. Immune functions of the skin. *Clin Dermatol.* 2001;19:573-85.
- [11] Salmon JK, Armstrong CA, Ansel JC. The skin as an immune organ. *West J Med.* 1994;160:146-52.
- [12] Slominski A, Wortsman J. Neuroendocrinology of the skin. *Endocr Rev.* 2000;21:457-87.
- [13] Olszewski WL. The innate reaction of the human skin lymphatic system to foreign and self-antigens. *Lymphat Res Biol.* 2005;3:50-7.
- [14] Schaubert J, Gallo RL. The vitamin D pathway: a new target for control of the skin's immune response? *Exp Dermatol.* 2008;17:633-9.
- [15] McGlone F, Reilly D. The cutaneous sensory system. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews.* 2010;34:148-59.
- [16] Chuong CM, Nickoloff BJ, Elias PM, Goldsmith LA, Macher E, Maderson PA, et al. What is the 'true' function of skin? *Exp Dermatol.* 2002;11:159-87.
- [17] Boulais N, Misery L. The epidermis: a sensory tissue. *Eur J Dermatol.* 2008;18:119-27.
- [18] Misery L. Skin, immunity and the nervous system. *Br J Dermatol.* 1997;137:843-50.
- [19] Schey BM, Williams DY, Bucknall T. Skin temperature and core-peripheral temperature gradient as markers of hemodynamic status in critically ill patients: A review. *Heart & Lung: The Journal of Acute and Critical Care.* 39:27-40.

- [20] Rutter N. The dermis. *Semin Neonatol.* 2000;5:297-302.
- [21] Damas J, Garbacki N, Liegeois JF, Juchmes J. [Control of cutaneous blood vessels]. *Rev Med Liege.* 2001;56:846-9.
- [22] Kellogg DL, Jr. In vivo mechanisms of cutaneous vasodilation and vasoconstriction in humans during thermoregulatory challenges. *J Appl Physiol.* 2006;100:1709-18.
- [23] Theoret C. Tissue engineering in wound repair: the three "R"s--repair, replace, regenerate. *Vet Surg.* 2009;38:905-13.
- [24] Bikle DD. Vitamin D and the skin. *J Bone Miner Metab.* 2010;28:117-30.
- [25] Lehmann B, Meurer M. Vitamin D metabolism. *Dermatol Ther.* 2010;23:2-12.
- [26] Guy RH. Transdermal drug delivery. *Handb Exp Pharmacol.* 2010:399-410.
- [27] Lee CM, Maibach HI. Deep percutaneous penetration into muscles and joints. *J Pharm Sci.* 2006;95:1405-13.
- [28] Kanitakis J. Immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol.* 1998;8:539-47.
- [29] Wysocki AB. Skin anatomy, physiology, and pathophysiology. *Nurs Clin N Am.* 1999;34:777-797.
- [30] Michel M, Torok N, Godbout MJ, Lussier M, Gaudreau P, Royal A, et al. Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage. *J Cell Sci.* 1996;109 (Pt 5):1017-28.
- [31] Watt FM. Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *EMBO J.* 2002;21:3919-26.
- [32] Koster MI. Making an epidermis. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1170:7-10.
- [33] Watt FM, Celso CL, Silva-Vargas V. Epidermal stem cells: an update. *Current Opinion in Genetics & Development.* 2006;16:518-24.
- [34] Pincelli C, Marconi A. Keratinocyte stem cells: friends and foes. *J Cell Physiol.* 2010;225:310-5.
- [35] Lippens S, Denecker G, Ovaere P, Vandenabeele P, Declercq W. Death penalty for keratinocytes: apoptosis versus cornification. *Cell Death Differ.* 2005;12 Suppl 2:1497-508.
- [36] Peltonen S, Raiko L, Peltonen J. Desmosomes in developing human epidermis. *Dermatol Res Pract.* 2010;2010:698761.
- [37] Ishida-Yamamoto A, Takahashi H, Iizuka H. Immunoelectron microscopy links molecules and morphology in the studies of keratinization. *Eur J Dermatol.* 2000;10:429-35.
- [38] Paladini RD, Takahashi K, Bravo NS, Coulombe PA. Onset of re-epithelialization after skin injury correlates with a reorganization of keratin filaments in wound edge keratinocytes: defining a potential role for keratin 16. *J Cell Biol.* 1996;132:381-97.

- [39] Eckert RL, Rorke EA. Molecular biology of keratinocyte differentiation. *Environ Health Perspect.* 1989;80:109-16.
- [40] Manabe M, O'Guin WM. Keratohyalin, trichohyalin and keratohyalin-trichohyalin hybrid granules: an overview. *J Dermatol.* 1992;19:749-55.
- [41] Morita K, Miyachi Y. Tight junctions in the skin. *J Dermatol Sci.* 2003;31:81-9.
- [42] Lippens S, Hoste E, Vandenabeele P, Agostinis P, Declercq W. Cell death in the skin. *Apoptosis.* 2009;14:549-69.
- [43] Rawlings AV, Matts PJ. Stratum corneum moisturization at the molecular level: an update in relation to the dry skin cycle. *J Invest Dermatol.* 2005;124:1099-110.
- [44] Niessen CM. Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol.* 2007;127:2525-32.
- [45] Bazzoni G, Dejana E. Keratinocyte junctions and the epidermal barrier: how to make a skin-tight dress. *J Cell Biol.* 2002;156:947-9.
- [46] Brandner JM, Kief S, Grund C, Rendl M, Houdek P, Kuhn C, et al. Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes. *Eur J Cell Biol.* 2002;81:253-63.
- [47] Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, et al. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol.* 2002;156:1099-111.
- [48] Thomason HA, Scothern A, McHarg S, Garrod DR. Desmosomes: adhesive strength and signalling in health and disease. *Biochem J.* 2010;429:419-33.
- [49] Moll R, Moll I. Epidermal adhesion molecules and basement membrane components as target structures of autoimmunity. *Virchows Arch.* 1998;432:487-504.
- [50] van Steensel MA. Gap junction diseases of the skin. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2004;131C:12-9.
- [51] Salomon D, Masgrau E, Vischer S, Ullrich S, Dupont E, Sappino P, et al. Topography of mammalian connexins in human skin. *J Invest Dermatol.* 1994;103:240-7.
- [52] Masunaga T. Epidermal basement membrane: its molecular organization and blistering disorders. *Connect Tissue Res.* 2006;47:55-66.
- [53] McMillan JR, Akiyama M, Shimizu H. Epidermal basement membrane zone components: ultrastructural distribution and molecular interactions. *J Dermatol Sci.* 2003;31:169-77.
- [54] Aumailley M, Rousselle P. Laminins of the dermo-epidermal junction. *Matrix Biology.* 1999;18:19-28.
- [55] Timpl R. Macromolecular organization of basement membranes. *Current Opinion in Cell Biology.* 1996;8:618-24.
- [56] Uitto J, Pulkkinen L. Molecular complexity of the cutaneous basement membrane zone. *Mol Biol Rep.* 1996;23:35-46.

- [57] Fleischmajer R, Perlish JS, MacDonald ED, 2nd, Schechter A, Murdoch AD, Iozzo RV, et al. There is binding of collagen IV to beta 1 integrin during early skin basement membrane assembly. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;857:212-27.
- [58] Ghohestani RF, Li K, Rousselle P, Uitto J. Molecular organization of the cutaneous basement membrane zone. *Clin Dermatol.* 2001;19:551-62.
- [59] Nishiyama T, Amano S, Tsunenaga M, Kadoya K, Takeda A, Adachi E, et al. The importance of laminin 5 in the dermal-epidermal basement membrane. *J Dermatol Sci.* 2000;24 Suppl 1:S51-9.
- [60] Kruegel J, Miosge N. Basement membrane components are key players in specialized extracellular matrices. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67:2879-95.
- [61] Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2003;55:1531-46.
- [62] Gordon MK, Hahn RA. Collagens. *Cell Tissue Res.* 2010;339:247-57.
- [63] Myllyharju J, Kivirikko KI. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends in Genetics.* 2004;20:33-43.
- [64] Ko SH, Nauta A, Wong V, Glotzbach J, Gurtner GC, Longaker MT. The role of stem cells in cutaneous wound healing: what do we really know? *Plast Reconstr Surg.* 2011;127 Suppl 1:10S-20S.
- [65] Curri SB. [Microvascular anatomy of the skin and its appendages]. *Phlebologie.* 1990;43:407-30.
- [66] Braverman IM. The cutaneous microcirculation. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2000;5:3-9.
- [67] Yoneda A, Couchman JR. Regulation of cytoskeletal organization by syndecan transmembrane proteoglycans. *Matrix biology.* 2003;22:25-33.
- [68] Matthias C. Regulation of extracellular matrix gene expression by mechanical stress. *Matrix Biology.* 1999;18:417-26.
- [69] Brakebusch C, Fassler R. The integrin-actin connection, an eternal love affair. *The EMBO Journal.* 2003;22:2324-33.
- [70] Schwartz MA. Integrins and extracellular matrix in mechanotransduction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.* 2010;2:a005066.
- [71] Lehoux S, Tedgui A. [Shear and signal transduction in the endothelial cell]. *Med Sci (Paris).* 2004;20:551-6.
- [72] Carragher NO, Frame MC. Focal adhesion and actin dynamics: a place where kinases and proteases meet to promote invasion. *Trends in Cell Biology.* 2004;14:241-9.
- [73] Wong VW, Akaishi S, Longaker MT, Gurtner GC. Pushing Back: Wound Mechanotransduction in Repair and Regeneration. *J Invest Dermatol.* 2011;131:2186-96.
- [74] Comoglio PM, Boccaccio C, Trusolino L. Interactions between growth factor receptors and adhesion molecules: breaking the rules. *Current Opinion in Cell Biology.* 2003;15:565-71.

- [75] Knies Y, Bernd A, Kaufmann R, Bereiter-Hahn J, Kippenberger S. Mechanical stretch induces clustering of beta1-integrins and facilitates adhesion. *Exp Dermatol*. 2006;15:347-55.
- [76] Desprat N, Farge E. [In search of the molecular mechano-transducers of the cell]. *Med Sci (Paris)*. 2007;23:583-5.
- [77] Deroanne CF, Lapiere CM, Nusgens BV. In vitro tubulogenesis of endothelial cells by relaxation of the coupling extracellular matrix-cytoskeleton. *Cardiovasc Res*. 2001;49:647-58.
- [78] Lambert Ch A, Nusgens BV, Lapiere Ch M. Mechano-sensing and mechano-reaction of soft connective tissue cells. *Adv Space Res*. 1998;21:1081-91.
- [79] Lambert CA, Colige AC, Munaut C, Lapière CM, Nusgens BV. Distinct pathways in the over-expression of matrix metalloproteinases in human fibroblasts by relaxation of mechanical tension. *Matrix Biology*. 2001;20:397-408.
- [80] Chiquet M, Renedo AS, Huber F, Flück M. How do fibroblasts translate mechanical signals into changes in extracellular matrix production? *Matrix Biology*. 2003;22:73-80.
- [81] Gurtner GC, Dauskardt RH, Wong VW, Bhatt KA, Wu K, Vial IN, et al. Improving cutaneous scar formation by controlling the mechanical environment: large animal and phase I studies. *Ann Surg*. 2011;254:217-25.
- [82] Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *The Journal of Pathology*. 2003;200:500-3.
- [83] Desmouliere A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen*. 2005;13:7-12.
- [84] Park H, Copeland C, Henry S, Barbul A. Complex wounds and their management. *Surg Clin North Am*. 2010;90:1181-94.
- [85] Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound Repair and Regeneration. *Nature*. 2008;453:314-21.
- [86] Theoret CL. The pathophysiology of wound repair. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 2005;21:1-13.
- [87] Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*. 1999;341:738-46.
- [88] Blakytyn R, Jude E. The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. *Diabet Med*. 2006;23:594-608.
- [89] Bullard KM, Longaker MT, Lorenz HP. Fetal wound healing: current biology. *World J Surg*. 2003;27:54-61.
- [90] Adzick NS, Lorenz HP. Cells, matrix, growth factors, and the surgeon. The biology of scarless fetal wound repair. *Ann Surg*. 1994;220:10-8.
- [91] Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*. 2008;16:585-601.
- [92] Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 1997;276:75-81.

- [93] Toriseva M, Kahari VM. Proteinases in cutaneous wound healing. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66:203-24.
- [94] Kondo T, Ishida Y. Molecular pathology of wound healing. *Forensic Science International.* 2010;203:93-8.
- [95] Theoret CL. Update on wound repair. *Clinical Techniques in Equine Practice.* 2004;3:110-22.
- [96] Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol.* 2007;127:514-25.
- [97] Baum CL, Arpey CJ. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatol Surg.* 2005;31:674-86; discussion 86.
- [98] Clark RA, Ghosh K, Tonnesen MG. Tissue engineering for cutaneous wounds. *J Invest Dermatol.* 2007;127:1018-29.
- [99] Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in Dermatology.* 25:9-18.
- [100] Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev.* 2003;83:835-70.
- [101] Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res.* 2010;89:219-29.
- [102] Cavani A, Zambruno G, Marconi A, Manca V, Marchetti M, Giannetti A. Distinctive integrin expression in the newly forming epidermis during wound healing in humans. *J Invest Dermatol.* 1993;101:600-4.
- [103] Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol.* 2007;127:526-37.
- [104] Mori L, Bellini A, Stacey MA, Schmidt M, Mattoli S. Fibrocytes contribute to the myofibroblast population in wounded skin and originate from the bone marrow. *Exp Cell Res.* 2005;304:81-90.
- [105] Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol.* 2007;170:1807-16.
- [106] Amadeu TP, Coulomb B, Desmouliere A, Costa AM. Cutaneous wound healing: myofibroblastic differentiation and in vitro models. *Int J Low Extrem Wounds.* 2003;2:60-8.
- [107] Darby I, Skalli O, Gabbiani G. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest.* 1990;63:21-9.
- [108] Boateng JS, Matthews KH, Stevens HN, Eccleston GM. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *J Pharm Sci.* 2008;97:2892-923.
- [109] Menke NB, Ward KR, Witten TM, Bonchev DG, Diegelmann RF. Impaired wound healing. *Clinics in Dermatology.* 2007;25:19-25.
- [110] Jeffcoate WJ, Price P, Harding KG. Wound healing and treatments for people with diabetic foot ulcers. *Diabetes Metab Res Rev.* 2004;20 Suppl 1:S78-89.

- [111] Beer HD, Longaker MT, Werner S. Reduced expression of PDGF and PDGF receptors during impaired wound healing. *J Invest Dermatol.* 1997;109:132-8.
- [112] Lobmann R, Pap T, Ambrosch A, Waldmann K, König W, Lehnert H. Differential effects of PDGF-BB on matrix metalloproteases and cytokine release in fibroblasts of Type 2 diabetic patients and normal controls in vitro. *Journal of Diabetes and its Complications.* 20:105-12.
- [113] Loot MA, Kenter SB, Au FL, van Galen WJ, Middelkoop E, Bos JD, et al. Fibroblasts derived from chronic diabetic ulcers differ in their response to stimulation with EGF, IGF-I, bFGF and PDGF-AB compared to controls. *Eur J Cell Biol.* 2002;81:153-60.
- [114] Cherubino M, Rubin JP, Miljkovic N, Kelmendi-Doko A, Marra KG. Adipose-derived stem cells for wound healing applications. *Annals of Plastic Surgery.* 2011;66:210-5.
- [115] Ehrenreich M, Ruszczak Z. Update on tissue-engineered biological dressings. *Tissue engineering.* 2006;12:2407-24.
- [116] Gonzalez-Consuegra RV, Verdu J. Quality of life in people with venous leg ulcers: an integrative review. *J Adv Nurs.* 2011;67:926-44.
- [117] Nwomeh BC, Yager DR, Cohen IK. Physiology of the chronic wound. *Clin Plast Surg.* 1998;25:341-56.
- [118] Bennett G, Dealey C, Posnett J. The cost of pressure ulcers in the UK. *Age Ageing.* 2004;33:230-5.
- [119] Vileikyte L. Diabetic foot ulcers: a quality of life issue. *Diabetes Metab Res Rev.* 2001;17:246-9.
- [120] Porter RM. Mouse models for human hair loss disorders. *J Anat.* 2003;202:125-31.
- [121] Wong VW, Sorkin M, Glotzbach JP, Longaker MT, Gurtner GC. Surgical approaches to create murine models of human wound healing. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:969618.
- [122] Aarabi S, Bhatt KA, Shi Y, Paterno J, Chang EI, Loh SA, et al. Mechanical load initiates hypertrophic scar formation through decreased cellular apoptosis. *FASEB J.* 2007;21:3250-61.
- [123] Wood SH, Sojitra NM. Dressings. *Surgery (Oxford).* 2002;20:142-4.
- [124] Kirsner RS, Falanga V, Eaglstein WH. The development of bioengineered skin. *Trends in Biotechnology.* 1998;16:246-9.
- [125] Junkins-Hopkins JM. Biologic dressings. *Journal of the American Academy of Dermatology.* 2011;64:e5-e7.
- [126] Chern PL, Baum CL, Arpey CJ. Biologic dressings: current applications and limitations in dermatologic surgery. *Dermatol Surg.* 2009;35:891-906.
- [127] Atiyeh BS, Hayek SN, Gunn SW. New technologies for burn wound closure and healing--review of the literature. *Burns.* 2005;31:944-56.
- [128] Grasset N, Raffoul W, Bigliardi P. [Bioactive dressings]. *Rev Med Suisse.* 2010;6:354-7.

- [129] Zhong SP, Zhang YZ, Lim CT. Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction. *Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2010;2:510-25.
- [130] Gottrup F, Jorgensen B. Maggot debridement: an alternative method for debridement. *Eplasty*. 2011;11:e33.
- [131] Montembault A, Viton C, Domard A. Physico-chemical studies of the gelation of chitosan in a hydroalcoholic medium. *Biomaterials*. 2005;26:933-43.
- [132] Alves NM, Mano JF. Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2008;43:401-14.
- [133] Senel S, McClure SJ. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2004;56:1467-80.
- [134] Francesko A, Tzanov T. Chitin, Chitosan and Derivatives for Wound Healing and Tissue Engineering. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2010.
- [135] Ribeiro MP, Espiga A, Silva D, Baptista P, Henriques J, Ferreira C, et al. Development of a new chitosan hydrogel for wound dressing. *Wound Repair Regen*. 2009;17:817-24.
- [136] Chandy T, Sharma CP. Chitosan--as a biomaterial. *Biomater Artif Cells Artif Organs*. 1990;18:1-24.
- [137] Khor E, Lim LY. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*. 2003;24:2339-49.
- [138] Shi C, Zhu Y, Ran X, Wang M, Su Y, Cheng T. Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine. *The Journal of Surgical Research*. 2006;133:185-92.
- [139] Kim IY, Seo SJ, Moon HS, Yoo MK, Park IY, Kim BC, et al. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnol Adv*. 2008;26:1-21.
- [140] Hong JP, Kim YW, Lee SK, Kim SH, Min KH. The effect of continuous release of recombinant human epidermal growth factor (rh-EGF) in chitosan film on full thickness excisional porcine wounds. *Ann Plast Surg*. 2008;61:457-62.
- [141] VandeVord PJ, Matthew HW, DeSilva SP, Mayton L, Wu B, Wooley PH. Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice. *J Biomed Mater Res*. 2002;59:585-90.
- [142] Ong SY, Wu J, Mochhala SM, Tan MH, Lu J. Development of a chitosan-based wound dressing with improved hemostatic and antimicrobial properties. *Biomaterials*. 2008;29:4323-32.
- [143] Barbosa JN, Amaral IF, Aguas AP, Barbosa MA. Evaluation of the effect of the degree of acetylation on the inflammatory response to 3D porous chitosan scaffolds. *J Biomed Mater Res A*. 2010;93:20-8.
- [144] Mangiapia G, Frielinghaus H, D'Errico G, Ortona O, Sartorio R, Paduano L. Physico-chemical and structural properties of hydrogels formed by chitosan, in the presence and absence of poly(vinylpyrrolidone) and sodium decylsulfate. *Phys Chem Chem Phys*. 2007;9:6150-8.

- [145] Bhatnagar A, Sillanpää M. Applications of chitin- and chitosan-derivatives for the detoxification of water and wastewater -- A short review. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2009;152:26-38.
- [146] Jayakumar R, Prabakaran M, Sudheesh Kumar PT, Nair SV, Tamura H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology Advances*. 2011;29:322-37.
- [147] Ueno H, Yamada H, Tanaka I, Kaba N, Matsuura M, Okumura M, et al. Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. *Biomaterials*. 1999;20:1407-14.
- [148] Devlin JJ, Kircher S, Kozen BG, Littlejohn LF, Johnson AS. Comparison of ChitoFlex®, CELOX(TM), and QuikClot® in Control of Hemorrhage. *Journal of Emergency Medicine*. In Press, Corrected Proof.
- [149] Brown MA, Daya MR, Worley JA. Experience with Chitosan Dressings in a Civilian EMS System. *Journal of Emergency Medicine*. 2009;37:1-7.
- [150] Barnes CP, Sell SA, Boland ED, Simpson DG, Bowlin GL. Nanofiber technology: designing the next generation of tissue engineering scaffolds. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59:1413-33.
- [151] Lee KY, Jeong L, Kang YO, Lee SJ, Park WH. Electrospinning of polysaccharides for regenerative medicine. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009;61:1020-32.
- [152] Venugopal J, Ramakrishna S. Applications of polymer nanofibers in biomedicine and biotechnology. *Appl Biochem Biotechnol*. 2005;125:147-58.
- [153] Jayakumar R, Prabakaran M, Nair SV, Tamura H. Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications. *Biotechnol Adv*. 2010;28:142-50.
- [154] Bates DO. Vascular endothelial growth factors and vascular permeability. *Cardiovasc Res*. 2010;87:262-71.
- [155] Ferrara N. VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth. *Eur Cytokine Netw*. 2009;20:158-63.
- [156] Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med*. 2005;9:777-94.
- [157] Mineur P, Colige AC, Deroanne CF, Dubail J, Kesteloot F, Habraken Y, et al. Newly identified biologically active and proteolysis-resistant VEGF-A isoform VEGF111 is induced by genotoxic agents. *J Cell Biol*. 2007;179:1261-73.
- [158] Lodomery MR, Harper SJ, Bates DO. Alternative splicing in angiogenesis: The vascular endothelial growth factor paradigm. *Cancer Letters*. 2007;249:133-42.
- [159] Roth D, Piekarek M, Paulsson M, Christ H, Bloch W, Krieg T, et al. Plasmin modulates vascular endothelial growth factor-A-mediated angiogenesis during wound repair. *The American Journal of Pathology*. 2006;168:670-84.
- [160] Galiano RD, Tepper OM, Pelo CR, Bhatt KA, Callaghan M, Bastidas N, et al. Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased

angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. *The American Journal of Pathology*. 2004;164:1935-47.

[161] Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, Golinko MS, Ehrlich HP, Brem H. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *The Journal of Surgical Research*. 2009;153:347-58.

[162] Saaristo A, Tammela T, Farkkila A, Karkkainen M, Suominen E, Yla-Herttuala S, et al. Vascular endothelial growth factor-C accelerates diabetic wound healing. *The American Journal of Pathology*. 2006;169:1080-7.

[163] Itoh N. The Fgf families in humans, mice, and zebrafish: their evolutionary processes and roles in development, metabolism, and disease. *Biological & pharmaceutical Bulletin*. 2007;30:1819-25.

[164] Givol D, Yayon A. Complexity of FGF receptors: genetic basis for structural diversity and functional specificity. *FASEB Journal*. 1992;6:3362-9.

[165] Klint P, Claesson-Welsh L. Signal transduction by fibroblast growth factor receptors. *Frontiers in Bioscience*. 1999;4:D165-77.

[166] Zhang Z, Coomans C, David G. Membrane heparan sulfate proteoglycan-supported FGF2-FGFR1 signaling: evidence in support of the "cooperative end structures" model. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276:41921-9.

[167] Ornitz DM, Yayon A, Flanagan JG, Svahn CM, Levi E, Leder P. Heparin is required for cell-free binding of basic fibroblast growth factor to a soluble receptor and for mitogenesis in whole cells. *Molecular and Cellular Biology*. 1992;12:240-7.

[168] Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell*. 1991;64:841-8.

[169] McGee GS, Davidson JM, Buckley A, Sommer A, Woodward SC, Aquino AM, et al. Recombinant basic fibroblast growth factor accelerates wound healing. *Journal of Surgical Research*. 1988;45:145-53.

[170] Park CJ, Clark SG, Lichtensteiger CA, Jamison RD, Johnson AJ. Accelerated wound closure of pressure ulcers in aged mice by chitosan scaffolds with and without bFGF. *Acta Biomater*. 2009;5:1926-36.

[171] Raab G, Klagsbrun M. Heparin-binding EGF-like growth factor. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1997;1333:F179-99.

[172] Jung HJ, Park K, Kim JJ, Lee JH, Han KO, Han DK. Effect of RGD-immobilized dual-pore poly(L-lactic acid) scaffolds on chondrocyte proliferation and extracellular matrix production. *Artif Organs*. 2008;32:981-9.

[173] Massia SP, Hubbell JA. Covalently attached GRGD on polymer surfaces promotes biospecific adhesion of mammalian cells. *Ann N Y Acad Sci*. 1990;589:261-70.

[174] Li J, Yun H, Gong Y, Zhao N, Zhang X. Investigation of MC3T3-E1 cell behavior on the surface of GRGDS-coupled chitosan. *Biomacromolecules*. 2006;7:1112-23.

- [175] Chatelet C, Damour O, Domard A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials*. 2001;22:261-8.
- [176] Bhattarai N, Edmondson D, Veisheh O, Matsen FA, Zhang M. Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility. *Biomaterials*. 2005;26:6176-84.
- [177] Saranya N, Moorthi A, Saravanan S, Devi MP, Selvamurugan N. Chitosan and its derivatives for gene delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2011;48:234-8.
- [178] Vasconcelos A, Cavaco-Paulo A. Wound dressings for a proteolytic-rich environment. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011;90:445-60.
- [179] Chen M, Przyborowski M, Berthiaume F. Stem cells for skin tissue engineering and wound healing. *Crit Rev Biomed Eng*. 2009;37:399-421.
- [180] Moreira SM, Andrade FK, Domingues L, Gama M. Development of a strategy to functionalize a dextrin-based hydrogel for animal cell cultures using a starch-binding module fused to RGD sequence. *BMC Biotechnology*. 2008;8:78.
- [181] Jazwa A, Kucharzewska P, Leja J, Zagorska A, Sierpniowska A, Stepniowski J, et al. Combined vascular endothelial growth factor-A and fibroblast growth factor 4 gene transfer improves wound healing in diabetic mice. *Genet Vaccines Ther*. 2010;8:6.
- [182] Senet P. [Becaplermin gel (Regranex gel)]. *Ann Dermatol Venerol*. 2004;131:351-8.
- [183] Thein-Han WW, Misra RDK. Biomimetic chitosan–nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. 2009;5:1182-97.
- [184] Pochanavanich P, Suntornsuk W. Fungal chitosan production and its characterization. *Lett Appl Microbiol*. 2002;35:17-21.
- [185] Munir MM, Iskandar F, Khairurrijal, Okuyama K. High performance electrospinning system for fabricating highly uniform polymer nanofibers. *Rev Sci Instrum*. 2009;80:026106.
- [186] Schneider A, Wang XY, Kaplan DL, Garlick JA, Egles C. Biofunctionalized electrospun silk mats as a topical bioactive dressing for accelerated wound healing. *Acta Biomaterialia*. 2009;5:2570-8.
- [187] Zhong W, Xing MM, Maibach HI. Nanofibrous materials for wound care. *Cutan Ocul Toxicol*. 2010;29:143-52.
- [188] Cuy JL, Beckstead BL, Brown CD, Hoffman AS, Giachelli CM. Adhesive protein interactions with chitosan: consequences for valve endothelial cell growth on tissue-engineering materials. *J Biomed Mater Res A*. 2003;67:538-47.
- [189] Marastoni S, Ligresti G, Lorenzon E, Colombatti A, Mongiat M. Extracellular matrix: a matter of life and death. *Connective Tissue Research*. 2008;49:203-6.
- [190] Kim SH, Turnbull J, Guimond S. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J Endocrinol*. 2011;209:139-51.

- [191] Cao H, McHugh K, Chew SY, Anderson JM. The topographical effect of electrospun nanofibrous scaffolds on the in vivo and in vitro foreign body reaction. *J Biomed Mater Res A*. 2010;93:1151-9.
- [192] Tchemtchoua VT, Atanasova G, Aqil A, Filee P, Garbacki N, Vanhootehem O, et al. Development of a Chitosan Nanofibrillar Scaffold for Skin Repair and Regeneration. *Biomacromolecules*. 2011;12:3194-204.
- [193] Saino E, Focarete ML, Gualandi C, Emanuele E, Cornaglia AI, Imbriani M, et al. Effect of electrospun fiber diameter and alignment on macrophage activation and secretion of proinflammatory cytokines and chemokines. *Biomacromolecules*. 2011;12:1900-11.
- [194] McBane JE, Ebadi D, Sharifpoor S, Labow RS, Santerre JP. Differentiation of monocytes on a degradable, polar, hydrophobic, ionic polyurethane: Two-dimensional films vs. three-dimensional scaffolds. *Acta Biomaterialia*. 2011;7:115-22.
- [195] Chellat F, Tabrizian M, Dumitriu S, Chornet E, Magny P, Rivard CH, et al. In vitro and in vivo biocompatibility of chitosan-xanthan polyionic complex. *J Biomed Mater Res*. 2000;51:107-16.
- [196] Lim SM, Song DK, Oh SH, Lee-Yoon DS, Bae EH, Lee JH. In vitro and in vivo degradation behavior of acetylated chitosan porous beads. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2008;19:453-66.
- [197] Yang YM, Hu W, Wang XD, Gu XS. The controlling biodegradation of chitosan fibers by N-acetylation in vitro and in vivo. *J Mater Sci Mater Med*. 2007;18:2117-21.
- [198] Tomihata K, Ikada Y. In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. *Biomaterials*. 1997;18:567-75.
- [199] Desmouliere A, Redard M, Darby I, Gabbiani G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *The American Journal of Pathology*. 1995;146:56-66.
- [200] Yim EK, Darling EM, Kulangara K, Guilak F, Leong KW. Nanotopography-induced changes in focal adhesions, cytoskeletal organization, and mechanical properties of human mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2010;31:1299-306.
- [201] Yang Y, Leong KW. Nanoscale surfacing for regenerative medicine. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2010;2:478-95.
- [202] Peluso G, Petillo O, Ranieri M, Santin M, Ambrosio L, Calabro D, et al. Chitosan-mediated stimulation of macrophage function. *Biomaterials*. 1994;15:1215-20.
- [203] Mori T, Okumura M, Matsuura M, Ueno K, Tokura S, Okamoto Y, et al. Effects of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblasts in vitro. *Biomaterials*. 1997;18:947-51.
- [204] Ueno H, Mori T, Fujinaga T. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001;52:105-15.
- [205] Hirano S, Tsuchida H, Nagao N. N-acetylation in chitosan and the rate of its enzymic hydrolysis. *Biomaterials*. 1989;10:574-6.

- [206] Muzzarelli RA. Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. *Cell Mol Life Sci.* 1997;53:131-40.
- [207] Davidson JM. Animal models for wound repair. *Arch Dermatol Res.* 1998;290 Suppl:S1-11.
- [208] Sullivan TP, Eaglstein WH, Davis SC, Mertz P. THE PIG AS A MODEL FOR HUMAN WOUND HEALING. *Wound Repair and Regeneration.* 2001;9:66-76.
- [209] Wang JF, Olson ME, Reno CR, Wright JB, Hart DA. The pig as a model for excisional skin wound healing: characterization of the molecular and cellular biology, and bacteriology of the healing process. *Comparative Medicine.* 2001;51:341-8.
- [210] Zhang J, Ding L, Zhao Y, Sun W, Chen B, Lin H, et al. Collagen-targeting vascular endothelial growth factor improves cardiac performance after myocardial infarction. *Circulation.* 2009;119:1776-84.
- [211] Shi C, Chen W, Zhao Y, Chen B, Xiao Z, Wei Z, et al. Regeneration of full-thickness abdominal wall defects in rats using collagen scaffolds loaded with collagen-binding basic fibroblast growth factor. *Biomaterials.* 2011;32:753-9.
- [212] Ishikawa T, Terai H, Yamamoto T, Harada K, Kitajima T. Delivery of a Growth Factor Fusion Protein Having Collagen-Binding Activity to Wound Tissues. *Artificial Organs.* 2003;27:147-54.
- [213] Ishikawa T, Eguchi M, Wada M, Iwami Y, Tono K, Iwaguro H, et al. Establishment of a functionally active collagen-binding vascular endothelial growth factor fusion protein in situ. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:1998-2004.
- [214] Wang TW, Wu HC, Huang YC, Sun JS, Lin FH. The effect of self-designed bifunctional RGD-containing fusion protein on the behavior of human keratinocytes and dermal fibroblasts. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2006;79:379-87.
- [215] Harding SE. Mucoadhesive interactions. *Biochem Soc Trans.* 2003;31:1036-41.
- [216] Sogias IA, Williams AC, Khutoryanskiy VV. Why is chitosan mucoadhesive? *Biomacromolecules.* 2008;9:1837-42.